

Aus der
1. Medizinischen Klinik
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)
und dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)
der
Technischen Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Frau PD Dr. med. I. Ott

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)
des Instituts für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Neointimabildung nach Transplantation von humanen,
expandierten endothelialen Zellen im Carotis-Verletzungsmodell der Thymus-losen
Nacktratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Maren Patrizia Schürmann
aus
Ehingen (Donau)

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Köstlin

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern und meiner Schwester in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Koronare Herzerkrankung (KHK)	2
2.1.1	Atherosklerose	2
2.1.2	Herzinfarkt	4
2.2	Bedeutung in der Tiermedizin.....	4
2.2.1	KHK und Atherosklerose beim Tier allgemein	4
2.2.2	Einsatz von Tiermodellen bei der Erforschung von Atherosklerose	5
2.3	Therapieansätze der KHK.....	6
2.3.1	Chirurgischer Eingriff: Bypass-Operation.....	7
2.3.2	Perkutane Intervention	7
2.3.2.1	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und deren Alternativverfahren	8
2.3.2.2	Stent	9
2.3.3	Medikamentöse Therapie.....	10
2.4	Restenose	11
2.4.1	Restenose bei PTCA	12
2.4.1.1	Recoil und Remodeling.....	13
2.4.1.2	Neointima.....	13
2.4.2	Restenose bei Stent: In-Stent-Restenose (ISR).....	15
2.5	Allgemeines zu Stammzellen.....	17
2.6	Endotheliale Vorläuferzellen	18
2.6.1	Biologische Funktion von Endothelzellen und ihren Vorläuferzellen.....	18
2.6.2	Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzellen	19
2.6.3	Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten der endothelialen Vorläuferzellen	21
2.6.3.1	Allgemeines zu Vor- und Nachteilen.....	21
2.6.3.2	Einsatz von endothelialen Vorläuferzellen	21
2.6.3.3	Endotheliale Vorläuferzellen im Rahmen des Tumorgeschehens	25
2.7	Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra).....	26
2.7.1	Grundlagen zu IL-1ra.....	26
2.7.2	Bedeutung von IL-1ra im Zusammenhang der KHK.....	27

2.8	Carotis–Verletzungsmodell.....	28
2.8.1	Die Ratte als Tiermodell	28
2.8.2	Das Carotis-Verletzungsmodell bei der Ratte.....	29
3	Eigene Untersuchungen	30
3.1	Zielvorstellung und Gliederung des Gesamtprojektes	30
3.2	Ziel der eigenen Arbeit	31
3.3	Untersuchungsgut und Methodik	33
3.3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	33
3.3.2	Versuchsplan und Gruppeneinteilung	34
3.3.2.1	Vorversuch.....	34
3.3.2.2	Hauptversuch	36
3.3.3	Versuchsvorbereitung	37
3.3.3.1	Zellkultur.....	37
3.3.3.2	Gentransfer–Leervektor-IL-1ra.....	37
3.3.3.3	Quantitative Zellmigrationsuntersuchung.....	38
3.3.3.4	Zellgewinnung und Fluoreszenzlabeling	39
3.3.4	Versuchsdurchführung.....	41
3.3.4.1	Anästhesie und operatives Vorgehen.....	41
3.3.4.2	Postoperative Behandlung.....	44
3.3.5	Bestimmungsmethoden.....	44
3.3.5.1	Probengewinnung.....	44
3.3.5.2	Evans Blue-Färbung.....	45
3.3.5.3	Aufarbeitung der Gefrierproben.....	45
3.3.5.4	Aufarbeitung der Paraffinschnitte	46
3.3.5.5	Histomorphometrische Auswertung	47
3.3.5.6	Immunhistochemische Untersuchung	48
3.3.5.6.1	Allgemeines zur Methodik.....	49
3.3.5.6.2	Arbeitsprotokoll der Immunhistochemischen Färbung.....	51
3.3.5.6.3	Immunhistochemische Auswertung.....	55
3.3.5.7	Rechnerische Auswertung und Dokumentation.....	55

3.4	Ergebnisse	56
3.4.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	56
3.4.1.1	Verletzungsmodelle im Akut-Vergleich	56
3.4.1.2	Verletzungsmodelle im Langzeit-Vergleich	57
3.4.1.3	Nachweis der endothelialen Zellen (EC) mit Fluoreszenzfärbung	58
3.4.1.4	Immunhistologischer Nachweis der Zellen im Paraffinschnitt.....	60
3.4.2	Ergebnisse des Hauptversuches	62
3.4.2.1	Histomorphometrische Auswertung der EC- und der Kontrollgruppe	63
3.4.2.2	Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses der EC- und der Kontrollgruppe....	64
3.4.2.3	Histomorphometrische Auswertung der IL-1ra- und der Leervektorgruppe	65
3.4.2.4	Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses der IL-1ra- und der Leervektor- gruppe.....	66
3.4.2.5	Beispielbilder für die zur Histomorphometrie herangezogenen Schnitte in der Elastica-van-Giesson-Färbung im Überblick.....	67
3.4.2.6	Verlauf der Neointima als graphische Darstellung	68
3.4.2.7	Immunhistochemische Auswertung der proliferierenden Zellen der EC- und der Kontrollgruppe	70
3.4.2.8	Proliferationsindex der EC- und der Kontrollgruppe.....	71
3.4.2.9	Immunhistochemische Auswertung der proliferierenden Zellen der IL-1ra und der Leervektorgruppe	72
3.4.2.10	Vergleich der Proliferationsdaten der IL-1ra- und der Leervektorgruppe	73
3.4.2.11	Beispielbilder für Ki-67-gefärbte Schnitte.....	74
3.4.2.12	Anzahl der CD31-positiv gefärbten Zellen im Vergleich	76
4	Diskussion.....	77
4.1	Carotis-Verletzungsmodell an der Thymus-losen Nacktratte	77
4.2	Vorversuch	78
4.3	Hauptversuch	81
4.3.1	Endotheliale Zellen	81
4.3.2	IL-1ra	84
4.4	Verifizierung des Therapieerfolges.....	86
4.5	Endotheliale Vorläuferzellen-mögliche Therapieansätze in der Humanmedizin	88
4.6	Endotheliale Zellen-welchen Nutzen haben sie für die Tiermedizin?	90

4.7	Schlussfolgerung	91
4.8	Ausblick	91
5	Zusammenfassung	92
6	Summary	93
7	Literaturverzeichnis	94
8	Tabellenverzeichnis	110
9	Abbildungsverzeichnis	111
10	Abkürzungsverzeichnis	113
11	Danksagung	116
12	Lebenslauf	118

1 EINLEITUNG

„Macht doch den Fensterladen im Schlafgemache auf, damit mehr Licht herein komme“. Mit diesen Worten stirbt am 22. März 1832 ein sehr berühmter Herzpatienten, Johann Wolfgang von Goethe. Dessen tödliche Angina-pectoris-Anfälle kurz vor seinem Tod werden von seinem Hausarzt Dr. Vogel dokumentiert (SCHRENK 1969).

Die Koronare Herzkrankheit (KHK), deren Ursache meist in atherosklerotischen Veränderungen der Herzkranzarterien liegt, hat nicht an Aktualität verloren. Ganz im Gegenteil, sie steht heute in den Industrieländern an erster Stelle in Bezug auf Morbidität und Mortalität (ROSS 1999, WORTHLEY et al. 2001).

Die durch Atherosklerose hervorgerufene Einengung des Gefäßlumens versucht man durch unterschiedliche Methoden (z.B. Ballondilatation, Stentimplantation) aufzuweiten. Doch bei 20 bis 50% der Patienten kommt es nach einer Angioplastie zu einer erneuten Verengung (= Restenose) des behandelten Gefäßes (BHAGARVA et al. 2003).

Da das Endothel bei den oben genannten Therapieverfahren beschädigt wird, verliert es seine physiologische Schutzfunktion. Die glatten Muskelzellen (=smooth muscle cells, SMC) können unkontrolliert wachsen. Es entsteht das Phänomen der Neointimahyperplasie, das neben anderen Mechanismen eine Hauptursache bei der Restenose darstellt (O'BRIEN und SCHWARTZ 1994, LÜSCHER et al. 1997).

Eine wichtige, körpereigene Reparaturmaßnahme stellt die Reendothelialisierung mit im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (EPC) dar. ASAHARA et al. (1997) können als erste EPC aus dem Blut gewinnen. Seit dem befassen sich zahlreiche Arbeiten mit ihrer Funktion und ihrer Wirkung. Besonders ihrer Fähigkeit zur Reendothelialisierung und Neovaskulogenese wird Beachtung geschenkt (URBICH und DIMMLER 2004).

Bei diesen Untersuchungen werden in erster Linie aus Tieren gewonnene EPC herangezogen und diesen Tieren nach vorangegangener Verletzung autolog transplantiert (GRIESE et al. 2003 b, GULATI et al. 2004, KONG et al. 2004).

Die vorliegende Arbeit geht zum einen der Frage nach, ob und wo humane endotheliale Vorläuferzellen adhären können und welchen Effekt sie bei der Neointimabildung nach vorausgegangener Angioplastie im Modell an der Nacktratte ausüben.

Zum anderen soll untersucht werden, ob man durch die Überexpression des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) in endothelialen Zellen nach lokaler Transplantation Einfluss auf das Entzündungsgeschehen und somit auf die Neointimahyperplasie genommen werden kann.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Koronare Herzerkrankung (KHK)

Die KHK repräsentiert ein klinisches Syndrom aus Schmerz (Angina pectoris), Koronarinsuffizienz und den gravierenden Folgeerkrankungen (Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, bedrohliche Herzrhythmusstörungen, plötzlicher Herztod u.a.) (STRAUER 1997).

Jüngste Studien in den USA haben wieder ergeben, dass Herzerkrankungen mit ca. 700 000 Todesfällen pro Jahr die Todesursache Nummer 1 darstellen. Der wirtschaftliche Schaden, der durch kardiovaskuläre Erkrankungen hervorgerufen wird, beläuft sich dabei jährlich auf ca. 370 Milliarden US-Dollar (NHLBI 2004).

Die KHK zählt aufgrund ihrer Pathogenese zu den atherosklerotischen Gefäßerkrankungen. Die Atherosklerose stellt ein multifaktorielles Geschehen dar, zu dem Hyperlipidämie, Hypertension, Übergewicht, Rauchen, Diabetes und familiäre Disposition gezählt werden. Dabei gibt es aber auch eine Vielzahl von vaskulären Erkrankungen, die monogenetisch bedingt sind (ASSMANN et al. 1999, KOLENDA 2003, NABEL 2003).

Doch auch Luftverschmutzung soll ähnlich wie Rauchen ein Risikofaktor für KHK darstellen. Das Mortalitätsrisiko soll in diesem Fall um 8 bis 18% erhöht sein (POPE III et al. 2004).

2.1.1 Atherosklerose

Der Überbegriff der „Arteriosklerose“ umfasst alle chronisch-progressiven Gestalts- und Strukturveränderungen der Arterienwand, die weder ätiopathogenetisch noch morphologisch einheitlich sind (DAHME 1988).

Von „Atherosklerose“ spricht man, wenn u.a. durch Lipideinlagerung ein Grützebrei-ähnlicher Gewebeerfall in der Arterienwand entsteht. Im fortgeschrittenen Stadium kann dieser Inhalt ulzerieren und direkt bzw. indirekt (durch Auslösen einer Thrombusbildung) eine Embolie bewirken (DAHME 1988).

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle und mehrstufige Krankheit, die ein fortschreitendes, chronisches Entzündungsgeschehen darstellt, das letztendlich zu thrombotischen Komplikationen führen kann (LIBBY et al. 2002).

Ein wichtiger Faktor in der Genese der Atherosklerose sind die Lipoproteine. Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL) sind in der Lage, die intakte Endothelschranke zu durchdringen. Wenn LDL „altert“ unterliegt es einer chemischen Modifikation und wird von Makrophagen phagozytiert. Es bilden sich die sog. Schaumzellen. Kristallbildung von Cholesterin in den Makrophagen kann diese von innen aus zerstören. Dadurch entsteht ein Nekroseherd (RIEDE und SCHAEFER 1994).

Die frühere Annahme, dass die Atherosklerose nur eine reine Lipidspeicherkrankheit darstellt, ist heute überholt. Trotz des Erfolges einer medikamentösen Senkung des Cholesterinspiegels bei vielen Patienten (SHEPHERD et al. 1995), stellt die KHK immer noch die Todesursache Nummer 1 dar (MURRAY und LOPEZ 1997).

Einen Hinweis auf die Rolle des Entzündungsgeschehens gibt das so genannte „fatty streak“, eine frühe Gefäßläsion, die bereits bei Kindern und Jugendlichen auftritt. Anfangs besteht sie nur aus Makrophagen und Schaumzellen und weist in allen Verlaufsstadien auch die Anwesenheit von T-Lymphozyten auf (STARY et al. 1994).

Am Anfang der Atherosklerose steht eine Endothelverletzung, die nach der Response-to-injury-Hypothese zu Gefäßveränderungen führt (ROSS und GLOMSET 1976).

Eine Schädigung des Endothels kann durch Störung des Blutflusses (Scherkräfte) und durch freie Radikale verursacht werden. Diese können durch Rauchen, Diabetes, Hypertension und Infektionen, wie Herpes oder Chlamydien entstehen (ROSS und GLOMSET 1976, ROSS 1999).

Endothelverlust tritt aber auch mit zunehmendem Alter auf. Dieser Vorgang wird begleitet von Ödembildung sowie Erythrozyten- und Thrombozytenanlagerung (SIMS et al. 1989).

Endothelläsionen führen über veränderte Zelloberfläche zu einer verstärkten Aufnahme von Lipoproteinen und Entzündungszellen. Sekretion von Cytokinen und Chemokinen veranlasst die Proliferation glatter Muskelzellen und Makrophagen innerhalb der Gefäßwand (STARY et al. 1994, ROSS 1999, WORTHLEY et al. 2001).

Prokoagulatorische und prothrombotische Oberflächenstrukturen auf atherosklerotischen Läsionen bewirken eine Thrombusbildung und meist eine Gefäßverengung. Dieser entstehende Plaque kann sich, abhängig von intrinsischen (Zusammensetzung der Plaques) und extrinsischen Faktoren (Strömung des Blutflusses), lösen. Als Folge einer Plaqueruptur kann ein akutes Herzkranzgefäßsyndrom entstehen (WORTHLEY et al. 2001).

2.1.2 Herzinfarkt

Ischämische Herzerkrankungen stellen 50% aller kardiovaskulären Todesfälle dar. Das bedeutet 1,1 Millionen Herzinfarkte und mehr als 400 000 neu diagnostizierte, kongestive Herzerkrankungen jedes Jahr in den USA (ORLIC et al. 2002).

Wenn der koronare Blutfluss auf etwa 20% des normalen Zustandes reduziert wird, entsteht eine plötzlich einsetzende Myokardischämie, die auch die kontraktile Funktion des Herzens rapide herabsetzt (BRAUNWALD und PFEFFER 1991).

Die Infarktgröße hängt ab vom Versorgungsgebiet der verschlossenen Arterie und von der Dauer der Ischämie. Da das subendokardiale Myokard eine hohe Stoffwechselrate aufweist, reagiert es sehr sensibel auf Ischämie. Bereits 15 bis 20 Minuten nach Verschluss einer Koronararterie beginnt eine irreversible Schädigung der Kardiomyozyten (ORLIC et al. 2002).

Wenn die Infarktgröße 40% oder mehr des linken Ventrikels ausmacht, zieht dies eine ernsthafte myokardiale Dysfunktion nach sich (OLIVETTI et al. 1991).

Die Behandlung der Herzinsuffizienz im Endstadium ist sehr eingeschränkt. Mittel der Wahl bleibt in diesem Fall die Herztransplantation (HUGHES 2002).

2.2 Bedeutung in der Tiermedizin

2.2.1 KHK und Atherosklerose beim Tier allgemein

Atheromatöse Komponenten bei der Arteriosklerose werden nur beim Schwein, einigen Exoten, Vögeln oder Karnivoren gesehen (DAHME und SCHRÖDER 1982).

Wenn arteriosklerotische Gefäßveränderungen beim Hund auftreten, sind die kleinen Gefäße im Papillarmuskel des linken Ventrikels am stärksten betroffen. Sichere Kriterien für eine klare klinische Diagnose gibt es nicht (TRAUTVETTER 1997).

Hypercholesterinämie stellt beim Hund keinen primären Risikofaktor für Arterienveränderungen dar. Nur bei hypothyreoten Hunden werden schwere Fälle von Arteriosklerose beschrieben. Diese bezeichnet man als „hyperresponder dogs“ (SUTER 1994).

In einem Zeitraum von 14 Jahren hat die pathologische Untersuchung von insgesamt 12 348 Hunden bei 21 Tieren die Diagnose Atherosklerose ergeben. Myokardiale Fibrose und Infarkt

werden im Myokard beobachtet. Histologisch sind in den betroffenen Gefäßwänden Schaumzellen, mineralisiertes Material, Detritus und degenerierte Muskelzellen zu finden (LIU et al. 1986).

Bei den herbivoren Haustieren spielen Lipideinlagerungen und atheromatöse Arterienwandnekrosen keine große Rolle (DAHME 1988).

Exulzeration von atherosklerotischen Gebilden tritt bei Tieren sehr selten auf. Nur bei sehr alten Schweinen, Psittaziden und Straußenvögeln. Bei den weißen Leghorn-Hühnern wird eine endogene Hyperlipidämie beschrieben, die Atherombildung v.a. in der abdominalen Aorta bewirkt (DROMMER 1991).

2.2.2 Einsatz von Tiermodellen bei der Erforschung von Atherosklerose

Nach BADIMON (2001) können Kaninchen nur eine lipidreiche Gefäßverletzung entwickeln, wenn sie mit einer cholesterol- und fettreichen Nahrung gefüttert werden. Die gebildeten Atherome sind fettiger und makrophagenreicher als beim Menschen. Bei experimentellen Studien wird zu diesem Zweck häufig das weiße Neuseelandkaninchen benutzt (LAFONT et al. 1995, YANG et al. 2003).

Das Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL)-Kaninchen stellt ein Modell für die menschliche Hypercholesterolämie dar. Als Folge von einem LDL-Rezeptordefizit werden bei diesen gezüchteten Tieren in der Intima LDL und Chylomikronenreste zurückbehalten (PROCTOR und MAMO 2003).

Mäuse können dagegen ohne eine genetische Manipulation keine Atherosklerose entwickeln. Ihre Lipidphysiologie unterscheidet sich radikal von der des Menschen (CULLEN et al. 2003).

Mit der Züchtung von apoE-knockout-Mäusen ist es gelungen, einen hohen Triglyzerid- und Cholesterolspiegel und dadurch die frühe Entwicklung von Atherosklerose in diesen Tieren zu bewirken. Apolipoprotein E (apoE) ist als Glykoprotein ein Bestandteil aller Lipoproteinpartikel. Seine Hauptfunktion besteht darin, eine hohe Affinität für den Chylomikronenrezeptor zu schaffen und damit die Aufnahme von apoE-haltigen Partikeln in die Leber zu erlauben (JAWIEŃ et al. 2004).

Ratten stellen keine besonders guten Modelle bei der Atheroskleroseforschung dar, da sie keine spontane Gefäßveränderungen entwickeln (BADIMON 2001, CULLEN et al. 2003).

Schweine können mit entsprechender Fütterung Plasmacholesterinwerte erreichen, die ähnlich denen des Menschen sind, und atherosklerotische Veränderung aufweisen (MULLER et al. 1992, CULLEN et al. 2003). Aus Kostengründen hat man u.a. zum Zweck der Atheroskleroseforschung Miniaturschweine wie z.B. das Yucatan-Minischwein entwickelt (POST et al. 1997, DE SMET et al. 1998).

Bei einer Studie von GINZINGER et al. (1997) an Lipoproteinase-defiziente Katzen kann durch Diät eine Atherosklerose induziert werden. Gesunde Hunde bilden sehr selten eine Atherosklerose aus. Auf Gefäßintima-Verletzungen reagieren sie nur mit einer mäßigen Neointimabildung (MULLER et al. 1992, LAFONT und FAXON 1998).

Bei Tauben der White Carneau-Rasse können LAUPER et al. (1975) ab dem Alter von vier Jahren sichtbare atherosklerotische Läsionen nachweisen. Trotz dieser Atherosklerosebildung sind sie mit dem Mensch nicht vergleichbar, da ihre Cholesterinwerte im Normalbereich liegen. Man vermutet die Ursache in einem Gendefekt der Makrophagenfunktion (CULLEN et al. 2003).

Bei nichthumanen Primaten entwickeln sich bei entsprechender Fütterung zwar atherosklerotische Gefäßläsionen, doch dieser Prozess nimmt wie beim Menschen mehrere Monate bis Jahre in Anspruch. Die hohen Kosten, die aufwendige Haltung der Tiere und ethische Gründe sprechen gegen ein realistisches Modell (LAFONT und FAXON 1998).

2.3 Therapieansätze der KHK

Alle Maßnahmen, die für eine günstige Langzeitprognose der KHK eingesetzt werden, fasst man unter dem Begriff „Sekundärprävention“ zusammen. Dazu zählen die interventionellen Eingriffe (Koronarer Bypass oder Perkutane Intervention), die medikamentöse Therapie und Lebensstil-Veränderungen. Zum letzt genannten zeigen eine Beendigung des Rauchens, koronarprotektive Ernährung, regelmäßige körperliche Aktivität und der Abbau von chronischen Stressbelastungen positive Effekte bei der Prävention (KOLENDA 2003).

Bei der interventionellen Therapie der KHK ist eine „Kausalbehandlung“ nach Auftreten der Beschwerden das Ziel. Das heißt Umgehen (Bypass) oder Beseitigung (Ballondilatation und Alternativverfahren) der zum Infarkt führenden Koronarstenose (STRAUER 1997).

Die medikamentöse Therapie zielt vor allem auf die Verbesserung des myokardialen Sauerstoffes, des koronaren Blutflusses und des Gefäßendothels ab (BÖTTIGER und FLEISCHER 1997, LÜSCHER et al. 1997).

2.3.1 Chirurgischer Eingriff: Bypass-Operation

Im Vergleich mit anderen Therapieverfahren hat sich gezeigt, dass die koronare Bypass-Operation unter anderem bei Mehrgefäßerkrankungen und bei eingeschränkter linksventrikulärer Funktion die überlegenere Therapie darstellt (GAMS 1997).

Bei der Operation wird unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation am stillgelegten Herz zwischen Aorta und den Koronargefäßen distal der Stenose ein neues Gefäß interponiert, um die ischämischen Bezirke wieder zu durchbluten (GAMS 1997).

Als autologes Bypassmaterial gelten V. saphena und A. mammaria interna. Die Endothelfunktionen von Arterie und Vene unterscheiden sich grundlegend. Transplantierte Arterien zeigen eine physiologische, endothelabhängige Dilatation, wenn sie mit den entsprechenden Reizen stimuliert werden. Die Venen dagegen reagieren darauf nur schwach bzw. gar nicht (LÜSCHER et al. 1997).

Aufgrund der besseren Langzeitergebnisse bei der Transplantation arterieller Gefäße, wird auch die A. thoracica interna benutzt. Auch die A. radialis findet in letzter Zeit Verwendung (GAMS 1997).

2.3.2 Perkutane Intervention

Die Geschichte der perkutanen Intervention lässt sich nach BHARGAVA et al. (2003) in drei Phasen einteilen:

- | | | |
|-----------|------------|--|
| 1. Phase: | 1977-87: | einfache Ballonangioplastie (PTCA, siehe unten) |
| 2. Phase: | 1988-92: | neue Angioplastie-Verfahren |
| 3. Phase: | 1993-2002: | die Stent-Revolution: Beschichtung mit Medikamenten oder Genen; intrakoronare Brachytherapie |

Katheterinterventionelle Verfahren sind bei entsprechender Indikation spontan und rasch durchführbar. Sie belasten den Patienten wenig, bedeuten einen kurzen Krankenhausaufenthalt und können falls erforderlich wiederholt werden (STRAUER 1997).

Die erfolgreiche Durchführung einer perkutanen Intervention ist abhängig von einer adäquaten Visualisierung und Darstellung der Stenose und der arteriellen Verästelungen.

In der Regel erfolgt dies durch das intrakoronare Injizieren von Kontrastmedium. Ein steuerbarer Führungsdraht wird in die Herzkranzgefäße und über die Stenose hinaus in einen distalen Ast geschoben. Über den Führungsdraht positioniert man einen Ballon (siehe Abbildung 1) oder einen Stent an der stenosierte Stelle. Der Stent wird dann direkt eingesetzt oder nach einer vorangegangenen Ballondilatation (GRECH 2003).

Die Kosten einer perkutanen Intervention belaufen sich in den USA auf \$ 10 000 bis \$ 12 000 pro Eingriff. Eine Bypass-Operation dagegen auf \$ 20 000 bis \$ 30 000 (LEMOS et al. 2003).

2.3.2.1 Perkutane Transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und deren Alternativverfahren

GRÜNTZIG (1978) führte im Jahr 1977 die erste PTCA bei einem 38-jährigen Mann erfolgreich durch. Seitdem gilt sie als klassische Standardmethode zur Behandlung von Koronarstenosen (HOMBACH et al. 1997, ARJOMAND et al. 2003).

Die hohe Restenoserate der PTCA versucht man durch die Entwicklung verschiedener, alternativer Verfahren zu senken. Doch auch damit besteht eine Restenosehäufigkeit von 20 bis 50% (HÖFLING et al. 1997, HOMBACH et al. 1997, ARJOMAND et al. 2003).

Bei der intrakoronaren Brachytherapie erfolgt die Behandlung mit niedrig dosierter ionisierter Strahlung. Über einen Katheter führt man das radioaktive Agens ein. Dies können Drähte, radioaktive Stöbe, Ballons gefüllt mit radioaktiven Gas oder Flüssigkeit sein.

Man unterscheidet zwischen γ - (wenig Energie, hohes Penetrationsvermögen) und β -Strahlen (hohe Energie, geringes Penetrationsvermögen) (BHARGAVA et al. 2003).

Die ionisierten Strahlen reduzieren die Neointimaproliferation durch Abnahme der mitochondrialen Aktivität der glatten Muskelzellen, indem sie Apoptose einleiten (RAJAGOPAL und ROCKSON 2003).

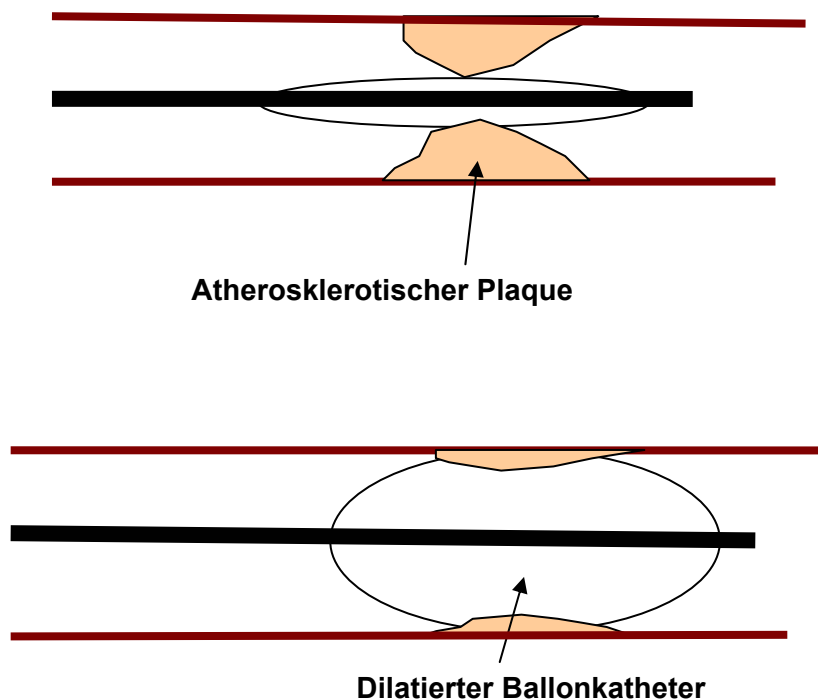


Abbildung 1: Schema einer einfachen Ballonangioplastie (PTCA) (modifiziert nach GRECH, 2003)

2.3.2.2 Stent

Stents stellen koronare Endoprothesen dar. Bereits vor der Einführung der PTCA, hat DOTTER (1969) spiralartige Endoprothesen in periphere Arterien des Hundes implantiert (SIGWART 1990).

Die erste Stentimplantation wurde von SIGWART et al. (1987) durchgeführt, und der Koronarstent somit in die Klinik eingeführt (KAUFMANN und MEIER 1997).

Durch ein Abstützen der arteriellen Wand sollen diese mechanischen Endoprothesen das Entstehen von akuten Gefäßokklusionen und die Restenosierungen nach vorangegangener Koronarangioplastie verhindern (POPMA und ELLIS 1990).

Der ideale Typ eines Stents sollte sicher implantierbar, flexibel, biokompatibel und nicht thrombogen sein und eine schnelle Endothelialisierung erlauben (SIGWART 1990).

Stents können aus verschiedenen Materialien bestehen und mit unterschiedlichen Beschichtungen versehen sein (HÖFLING et al. 1997, KAUFMANN und MEIER 1997, ARJOMAND et al. 2003, BHARGAVA et al. 2003).

Beschichtete Stents tragen auf ihrer Oberfläche ein pharmakologisches Agents, das die Neointimabildung verhindern soll. Dieses Agents ist an ein Vehikel gekoppelt, damit der Wirkstoff in der erforderlichen Konzentration an die Gefäßwand abgegeben werden kann (O'NEILL und LEON 2003).

Schätzungsweise 1 Million perkutane Interventionen werden in den USA jährlich durchgeführt, davon sind ca. 80% Stentimplantationen (LEMOS et al. 2003).

2.3.3 Medikamentöse Therapie

Das erste Ziel der medikamentösen Therapie besteht im Verbessern der myokardialen Sauerstoffbilanz. Durch Senken der Herzfrequenz, Verminderung der Kontraktilität oder der myokardialen Wandspannung kann man eine Reduzierung des Sauerstoffbedarfs erreichen. Eine Steigerung des Sauerstoffangebotes wird dagegen durch Erhöhung des koronaren Blutflusses und des arteriellen Sauerstoffgehaltes erzielt (BÖTTIGER und FLEISCHER 1997).

Verschiedene Wirkstoffe finden in diesem Zusammenhang ihre Verwendung:

β-Blocker hemmen adrenerge Reize und vermindern so die Herzarbeit und den myokardialen Sauerstoffbedarf durch Reduzierung der Herzfrequenz und der Kontraktilität (BÖTTIGER und FLEISCHER 1997).

Nitrate bewirken durch Freisetzung von NO aus ihrem eigenen Molekül an den glatten Muskelzellen eine Vasodilatation (LÜSCHER et al. 1997).

ACE-Hemmer reduzieren die Bildung von Angiotensin II sowie gleichzeitig den Abbau von Bradykinin, und sorgen auf diesem Weg für eine gesteigerte Bildung von vasodilatierendem NO (LÜSCHER et al. 1997).

Kalziumantagonisten bewirken ebenfalls eine Vasodilatation, in dem sie die glatte Gefäßmuskulatur relaxieren. Sie senken außerdem die Herzfrequenz und die myokardiale Kontraktilität, und verlangsamen die atrioventrikuläre Überleitung (BÖTTIGER und FLEISCHER 1997).

Als Thrombozytenaggregationshemmer ist die Acetylsalicylsäure (ASS) (Aspirin®) und der ADP-Rezeptor-Antagonist Clopidogrel zu nennen (HERLITZ 2004).

Der zweite Ansatz der medikamentösen Therapie dient als Prävention einer Restenose. Der Gefäßverschluss ist die ernsthafteste Komplikation nach einer Stentimplantation (ARJOMAND et al. 2003).

Als antikoagulative Substanz wird vor allem Heparin eingesetzt, das an Antithrombin III bindet. Nebenwirkungen sind allerdings Hämorrhagie und Thrombozytopenie (PHILIPP und GRECH 2003).

ASS hemmt die Cyclo-Oxygenase irreversibel, wird gut toleriert und zeigt wenige ernsthafte Nebenwirkungen, hat aber nur mäßige antithrombotische Wirkung und bei 10% der Patienten scheinbar keinen Effekt. Clopidogrel hemmt irreversibel die Bindung von ADP während der Thromozytenaktivierung. Die Kombination von ASS und Clopidogrel/Ticlopedin wird als Standardbegleitbehandlung bei der Stenttherapie eingesetzt (PHILIPP und GRECH 2003).

In einer klinischen Studie wird gezeigt, dass im Vergleich zu einer reinen antikoagulativen Therapie, eine Kombination mit einer antithrombotischen Therapie die Häufigkeit sowohl von kardialen Zwischenfällen als auch von hämorrhagischen und vaskulären Komplikationen reduzieren kann (SCHÖMIG et al. 1996).

Weitere antithrombotische Wirkung zeigen Glycoproteine IIb/IIIa-Rezeptorinhibitoren, in dem sie die Thrombozytenaggregation hemmen (PHILIPP und GRECH 2003).

Ein anderer Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie stellt das Entzündungsgeschehen dar. ASS und Clopidogrel zeigen ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung, und ACE-Hemmer zeigen vor allem in Bezug auf Makrophagen und auf glatte Muskelzellen einen antiinflammatorische Effekt (KEREIAKES 2003).

2.4 Restenose

Alle Formen der perkutanen Intervention setzen eine mehr oder weniger starke Verletzung in den Gefäßen und sind der Anlass für eine Restenose. Diese lässt sich in drei Typen einteilen. Die lokale Neointimahyperplasie stellt die histologische Restenose dar. Entwickelt sich eine signifikante Lumeneinengung von mehr als 50%, bezeichnet man sie als angiographische Restenose. Wenn Anzeichen bzw. Symptome einer Ischämie nach einer anfangs erfolgreichen Angioplastie auftreten, spricht man von einer klinische Restenose (KUNTZ und BAIM 1993, HÖFLING et al. 1997).

2.4.1 Restenose bei PTCA

Die Ballonangioplastie induziert eine Ereigniskette, die mit endothelialer Denudation beginnt, und nach einer deutlichen Proliferationsphase der SMC in vaskulären Umbauprozessen endet (EDELMAN und ROGERS 1998).

Das Endothel übt vor allem durch die Produktion von NO einen Einfluss auf die Integrität der Gefäßwand aus. NO wirkt relaxierend auf den Gefäßtonus und hemmend auf Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Es inhibiert die Replikation von SMC (SCHWARTZ et al. 1995, BAUTERS et al. 1996).

Die Restenose stellt das Ergebnis nach einem komplexen Heilungsprozess dar. Als Antwort auf eine Verletzung kommt es in der Gefäßwand zu folgenden Reparaturmaßnahmen:

1. Elastische Rückstellkräfte der Gefäßwand (elastischer Recoil)
2. Umbauprozesse des Gefäßes (Remodeling)
3. Thrombusbildung
4. Proliferation und Migration medialer glatter Muskelzellen (SMC)
5. Produktion von extrazellulärer Matrix

Diese Reparaturmaßnahmen bewirken als Endergebnis eine Lumenverengung (KANTOR et al. 1999).

Die folgende Abbildung 2 zeigt den Gefäßaufbau einer A. carotis mit Neointimahyperplasie:

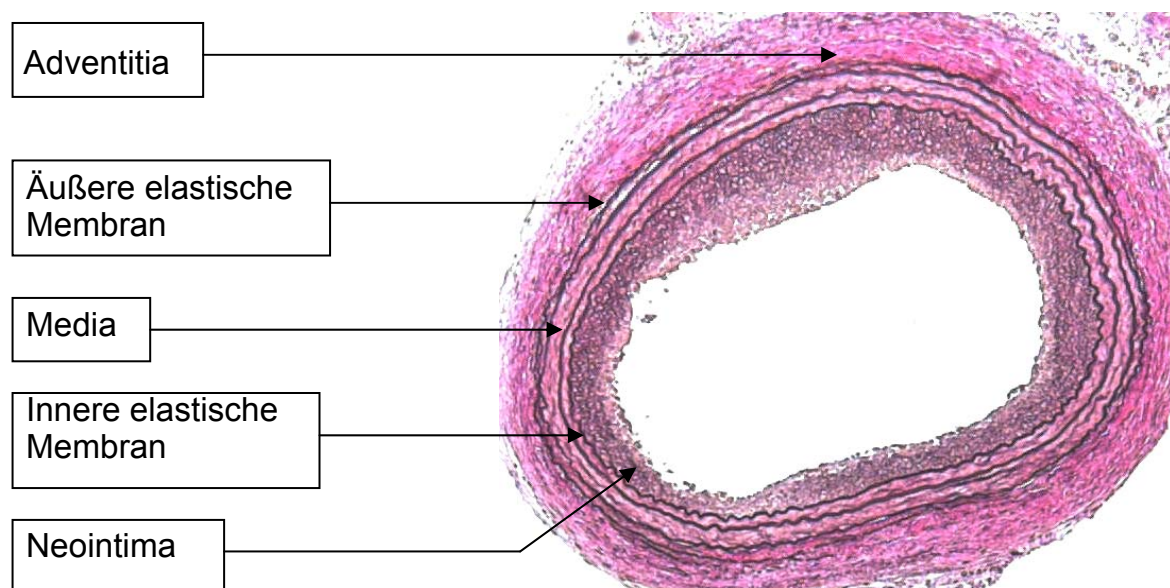


Abbildung 2: Querschnitt einer restenosierten Arterie, 5fache Vergrößerung, modifiziert nach O'BRIEN und SCHWARTZ (1994)

2.4.1.1 Recoil und Remodeling

Die frühen Rückstellkräfte, die sich innerhalb der ersten Stunden nach einer Angioplastie einstellen, bezeichnet man als elastische Rückstellkräfte oder elastischer Recoil (SCHWARTZ et al. 1995).

Der Ausdruck „Remodeling“ ist noch relativ jung. Er wird allgemein definiert als ein Wechsel des Arterienlumens (Weitung oder Kontraktion) (SCHWARTZ et al. 1998).

Das Remodeling ist eine natürliche Reaktion der Gefäße. Es erlaubt ihnen, den Blutfluss und die Gefäßspannung auf einer physiologischen Stufe zu erhalten und kommt sowohl bei den muskulären als auch bei den elastischen Arterien vor (SCHWARTZ et al. 1995).

Menschliche Arterien können sich bei fortschreitender Plaquebildung bis zu einem gewissen Grad adaptiv erweitern. Sie können das ursprüngliche Lumen solange aufrechterhalten, bis der Plaque 40% der Fläche innerhalb der inneren elastischen Membran ausfüllt (GLAGOV et al. 1987).

MINTZ et al. (1996) kommen in einer Ultraschallstudie zu dem Schluss, dass vor allem durch Gefäßkonstriktion (negatives Remodeling) und weniger durch Neointimabildung ein Lumenverlust bewirkt wird. Restenose nach PTCA stellt eine Kombination von negativen, vaskulären Remodeling und Neointimahyperplasie dar (LAFONT et al. 1995).

Über die Ursachen der Gefäßkonstriktion werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: (1) lokale Vasokonstriktion von SMC, (2) Konstriktion durch Fibrose im Bereich der äußeren elastischen Membran bzw. Adventitia oder (3) Verlust von Mediamasse durch die Auswanderung medialer SMC (LUO et al. 1996).

2.4.1.2 Neointima

Die arterielle Gefäßwand besteht aus drei Schichten: Der Intima, der Media und der Adventitia (siehe Abbildung 2). „Neointimahyperplasie“ bezeichnet eine Zellvermehrung in der Intima, die von einer verstärkten Bildung extrazellulärer Matrix begleitet wird (NEWBY und ZALTSMAN 2000).

Die Ausprägung der Neointimahyperplasie hängt von der Schwere der Verletzung des Gefäßes ab. Je mehr tiefer liegende Strukturen, wie die Media oder sogar die äußere, elasti-

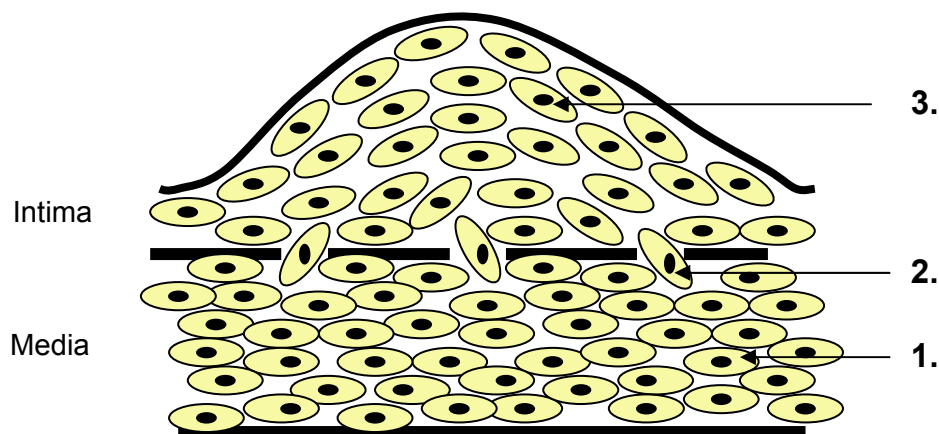
sche Membran verletzt werden, umso stärker kommt es zu einer Neointimabildung (SCHWARTZ et al. 1992, SCHWARTZ 1994).

Die Proliferation der SMC verläuft proportional zum Grad der Verletzung nach Ballondilatation und zum eingesetzten Balloninflationsdruck (INDOLFI et al. 1995).

Am Rattenmodell von CLOWES et al. (1983 b) werden drei Phasen der Neointimabildung nach Ballonangioplastie genauer untersucht und definiert:

Während der ersten Phase beginnen mindestens 20 bis 40% der medialen SMC (siehe Abbildung 3 (1.)) innerhalb von 24 Stunden zu proliferieren. Ihre höchste Proliferationsrate erreichen sie dabei nach 48 Stunden. Bei diesem Vorgang verändert sich ihr kontraktiler Phänotyp zu einem synthetisierenden, um anschließend in der zweiten Phase die Migration der medialen SMC durch die innere elastische Membran (2.) zu ermöglichen. Nach der Wanderung finden ebenfalls weitere Zellteilungen statt. Die Proliferation der intimalen SMC (3.), deren Maximum nach ca. 96 Stunden zu beobachten ist, führt zusammen mit der Bildung von extrazellulärer Matrix schließlich zur Bildung der Neointima. Während der dritten Phase bleiben die Zellen lumenwärts in der Neointima über Wochen und Monate hinaus weiter mitotisch aktiv, ohne dass sich aber die Gesamtzahl der Zellen in der Neointima ändert (CLOWES et al. 1983 b, BAUTERS et al. 1996).

Einige Veröffentlichungen sprechen noch von einer vierten Phase. Während dieser Zeit kann die Neointima durch Stimulation von mitogenen Faktoren im Blut weiterhin noch in der Lage sein, zunehmende Replikation aufzuweisen (SCHWARTZ et al 1995).



- 1.: mediale glatte Muskelzellen (mediale SMC)
- 2.: migrierende Muskelzellen
- 3.: intimale Muskelzellen

Abbildung 3: Migration glatter Muskelzellen (SMC) aus der Media in die Intima durch die gefensterte innere elastische Membran (modifiziert nach ROSS und GLOMSET, 1976)

Doch neuere Untersuchungen zeigen, dass an der Neointimabildung noch andere Prozesse beteiligt sind. So können HAN et al. (2001) in einem Mäuseversuch nachweisen, dass zirkulierende Knochenmarkszellen an der Neointimabildung teilhaben. Weibliche Mäuse werden bestrahlt und mit männlichen Knochenmarkszellen transfundiert. Nach einer Drahtverletzung zeigen sich nachweislich in der formierten Neointima Zellen der Donortiere. In einem ähnlichen Versuch lässt sich darstellen, dass auch aus dem Knochenmark stammende und zu SMC umgewandelte Zellen an der Intimahyperplasie beteiligt sind (TANAKA et al. 2003).

Recht widersprüchliche Aussagen gibt es zu der Hypothese, dass auch Zellen aus der Adventitia an der Neointimahyperplasie beteiligt sein sollen. COUFFINHAL et al. (2001) beschreiben in einem Ratten-Carotis-Modell, dass innerhalb der ersten 48 Stunden nach einer Ballonverletzung die wichtigsten Veränderungen in der Adventitia auftreten. Adventitielle Zellen translozieren in Media und Intima. Ermöglicht wird dieser Vorgang durch extensiven Zelltod in der Media. Eine andere Studie beschreibt die Beteiligung von adventitiellen Myofibroblasten an der Neointimahyperplasie in einem Modell am Schwein (SHI et al. 1996).

Dagegen postulieren DE LEON et al. (2001), dass adventitielle Myofibroblasten nach einer Angioplastie am Rattenmodell nicht in der Lage sind, in die Media oder Intima zu migrieren. Der Ursprung der intimalen Zellen bleibt ein kontroverses Streitthema in der Gefäßbiologie und der klinischen Kardiologie (ZALEWSKI et al. 2002).

2.4.2 Restenose bei Stent: In-Stent-Restenose (ISR)

Stents verhindern zwar das akute negative Remodeling der Koronargefäße nach der Angioplastie, aber da sie tiefere Verletzungen bewirken, induzieren sie mehr Neointimabildung (SCHWARTZ und HENRY 2002).

Protrahierte Verletzungen, Stents in kleinen Koronargefäßen und das Vorliegen einer Diabeteserkrankung sind prädisponierend für eine ISR. Koronares Stenting induziert entzündliche Vorgänge in der Arterie (FARB et al. 2002).

Die Stärke der lokalen Entzündung hängt dabei vom Verletzungsgrad der Media und von der Eindringtiefe des Stents in lipidreiche Plaquereste ab (FARB et al. 1999).

In einer Studie an mehr als 3000 Patienten zeigt sich eine geringe Gefäßweite als höchster Risikofaktor für eine ISR. Aber auch das Design des Stents beeinflusst die Restenose. Die Restenoserate liegt zwischen 20 und 50% (KASTRATI et al. 2001).

Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass nach einer Stentverletzung die Neointimabildung im Vergleich zu einer Ballonverletzung viermal längere Zeit benötigt (EDELMAN und ROGERS 1998).

Symptome einer ISR treten für gewöhnlich innerhalb von 6 bis 9 Monaten nach einem Eingriff auf (HOLMES 2001).

Die vier Phasen, die man nach der endovaskulären Implantation insgesamt beobachten kann, sind Thrombose, Entzündung, Proliferation und spätes Remodeling (EDELMAN und ROGERS 1998).

Die zellulären Prozesse der ersten drei Phasen von der Thrombus- bis hin zur Neointimabildung beschreiben SCHWARTZ und HENRY (2002):

1. Stadium: Thrombotische Phase: Tag 0 bis 3; Thrombusbildung nach Verletzung:
Abrupte Aktivierung, Adhäsion, Aggregation von Thrombozyten.
2. Stadium: Rekrutierungsphase: Tag 3 bis 8;
Entwicklung einer Endothelzellschicht unbekannten Ursprungs. Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten aus der Blutbahn in den Thrombus und Proliferation dieser Zellen.
3. Stadium: Proliferative Phase: Tag 8 bis Endheilung;
„Cap“-bildung von Aktin-positiven SMC-Zellen auf dem Thrombus. Diese wandern mediawärts, resorbieren den Thrombus und ersetzen ihn.
Proliferation und Migration von SMC lassen die Neointima anwachsen.

Eine vierte Phase besteht aus dem vaskulären Remodeling. In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen, ob diese Phase wirklich existiert. Nach SCHWARTZ (1998), HOLMES (2001) und SCHWARTZ und HENRY (2002) wird konstriktives Remodeling durch die Implantation von Stents verhindert. Dagegen postulieren EDELMAN und ROGERS (1998), dass zwar das Recoil-Phänomen damit verhindert werden kann, aber nicht das Remodeling. „Da die Arterie dynamisch ist und reagieren kann, widersetzt sie sich der Spannung der eingesetzten Stentstützen indem sie zunehmend Kollagen ablagert, deutlich Elastin abbaut und das Entzündungsgeschehen aufrechterhält“ (EDELMAN und ROGERS 1998).

Die folgende Abbildung 4 stellt zusammenfassend die Phasen der Restenose nach Ballonangioplastie bzw. Setzen eines Stents dar:

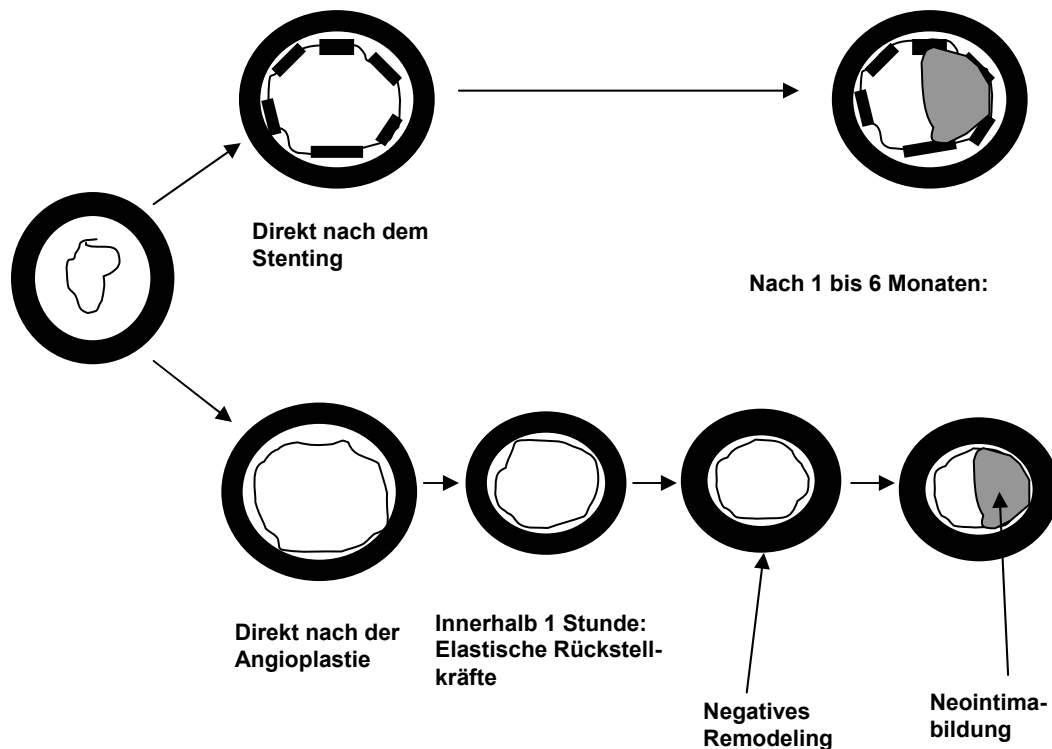


Abbildung 4: Ablauf der Restenose im Vergleich (modifiziert nach RAJAGOPAL und ROCKSON, 2003)

2.5 Allgemeines zu Stammzellen

Unter einer Stammzelle versteht man eine Zelle, die einerseits die Fähigkeit zur Selbstreplikation für unbestimmte Zeit besitzt, und die sich andererseits unter bestimmten Voraussetzungen in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren vermag (BREHM et al. 2002).

Nicht nur embryonale Stammzellen während der Embryonalentwicklung besitzen diese Fähigkeiten, sondern auch im Organismus nach dieser Zeit nachgewiesene, adulte Stammzellen. Das bedeutet, dass sie sich selbst replizieren und sich zu reifen Zellen ausdifferenzieren können. Die Entwicklung zu einer reifen Zelle läuft über den Weg von Zwischenstadien ab. Dieser Zelltyp wird als „Vorläuferzelle“, „Progenitor bzw. Precursor Cell“, bezeichnet. Adulte Stammzellen sind relativ selten. Der Anteil beispielsweise der Hämatopoetischen Stammzellen wird auf ca. 0,002% der Knochenmarkszellen geschätzt (NIH 2001).

Der Nachweis dieser Zellen gestaltet sich relativ schwierig. Zellmorphologie und Zelloberflächenstruktur dienen dabei als Anhaltspunkt. Das Phänomen der „Plastizität“ beschreibt die Fähigkeit der adulten Stammzellen, sich auch zu Zelltypen anderer Gewebe und anderer Ur-

sprungslinien umzudifferenzieren. ZUBAIR et al. (2002) haben zu diesem Thema Beispiele aus verschiedenen Tier- und Humanmodellen zusammengefasst. So können zum Beispiel die Umbildung von Knochenmarksstammzellen bzw. Endothelzellen in Herzmuskelzellen genannt werden (KOCHER et al. 2001, ORLIC et al. 2001).

2.6 Endotheliale Vorläuferzellen

2.6.1 Biologische Funktion von Endothelzellen und ihren Vorläuferzellen

Die Endothelzellen spielen als Auskleidung der Gefäßwände eine wichtige Rolle. Zum einen verhindern sie aufgrund ihrer negativ geladenen Oberfläche die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten, und zum anderen leisten sie durch die Produktion von Regulationsfaktoren, wie beispielsweise Prostaglandinen und NO, einen Beitrag zur Erhaltung des physiologischen Gleichgewichtes (CINES et al. 1998).

Die nicht zu unterschätzende Funktion der Endothelzellen spiegelt sich auch in ihren physiologischen Daten wieder: Ihre geschätzte Zahl liegt bei 1 bis 6×10^{13} , ihr Gewicht bei 1kg und ihre Fläche bei mehr als 1000 m² (AUGUSTIN et al. 1994, CINES et al. 1998).

Endothelzellen sind ebenfalls bei der Entstehung von Blutgefäßen beteiligt. Dabei bezeichnet man die Sprossung von bereits bestehenden Blutgefäßen durch Migration und Proliferation von Endothelzellen als Angiogenese. Dieser Prozess der Angiogenese wird durch eine Reihe von Faktoren gesteuert. Eine Rolle spielen dabei der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der Placenta Growth Factor (PLGF) und das Angiopoietin (Ang)-1. Die Faktoren VEGF-1 und VEGF-2 binden an den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2). Dieser Rezeptor wird im menschlichen Organismus auch als Kinase-insert-domain-containing-receptor (KDR) und in der Maus als Fetal-liver-kinase-1-receptor (Flk-1) bezeichnet (CINES et al. 1998, FREEDMAN und ISNER 2002, CARMELIET 2003).

Unter dem Begriff Arteriogenese versteht man als zweite Möglichkeit der Blutgefäßbildung die Erweiterung eines bereits bestehenden Kollateralgefäßes zu einem größeren Gefäß (ARRAS et al. 1998).

Der Begriff Vaskulogenese beschreibt die dritte Entstehungsart eines Blutgefäßes. Lange Zeit war man der Meinung, dass dieser Vorgang nur während der embryonalen Entwicklung

abliefe, und dass sich nur aus einem Angioblasten Gefäße de novo bilden können (RISAU und FLAMME 1995).

Heute weiß man, dass sich bei der Vaskulogenese neue Blutgefäße auch durch Wanderung und Zusammenschluss von endothelialen Vorläuferzellen und ihrer Differenzierung zu Endothelzellen bilden können. Die Untersuchungen von ASAHARA et al. (1997, 1999) leisteten zu dieser Erkenntnis einen wichtigen Beitrag.

So können ASAHARA et al. (1997) aus humanem peripherem Blut über eine Kombination aus magnetischen und immunologischen Prinzipien CD34-positive (CD34+) Zellen isolieren. Diese weisen in vitro in der Zellkultur eine Differenzierung zu Endothelzell-ähnlichen Zellen auf, die dabei ein Netzwerk und Tubulus-ähnliche Strukturen bilden. Aus diesem Grund erhalten sie auch den Namen mutmaßliche endotheliale Vorläuferzellen (EPC). In zwei Tiermodellen zur Ischämie wird außerdem eine aktive Beteiligung an der Angiogenese im ischämischen Gebiet und eine Inkorporation in die neu gebildeten Kapillare festgestellt. Weitere Untersuchungen finden sogar Beweise für eine postnatale Vaskulogenese (ASAHARA et al. 1999).

2.6.2 Charakterisierung der endothelialen Vorläuferzellen

Über den Ursprung der EPC gab es lange Zeit nur Vermutungen. Da hämatopoetische Stammzellen und EPC gemeinsame Oberflächenstrukturen besitzen, besteht die Hypothese von einem gemeinsamen Ursprung, dem Hämangioblast. CHOI et al. (1998) können in ihrer Studie beweisen, dass vom Embryo stammende Blast-Colony-forming-Zellen in einem engen Zeitraum (nur zwischen dem 2,5. d und 4.d) in der Lage sind, hämatopoetische und endotheliale Vorläuferzellen zu bilden zu. (Abbildung 5 zeigt dazu ein Schema, wie sich aus dem Hämangioplasten die hämatopoetischen und die vaskulären Stammzellen bzw. Vorläuferzellen entwickeln.) In zahlreichen Knochenmarkstransplantationsstudien kann das Knochenmark als Herkunftsort der EPC bestimmt werden (SHI et al. 1998, ASAHARA et al. 1999, LIN et al. 2000).

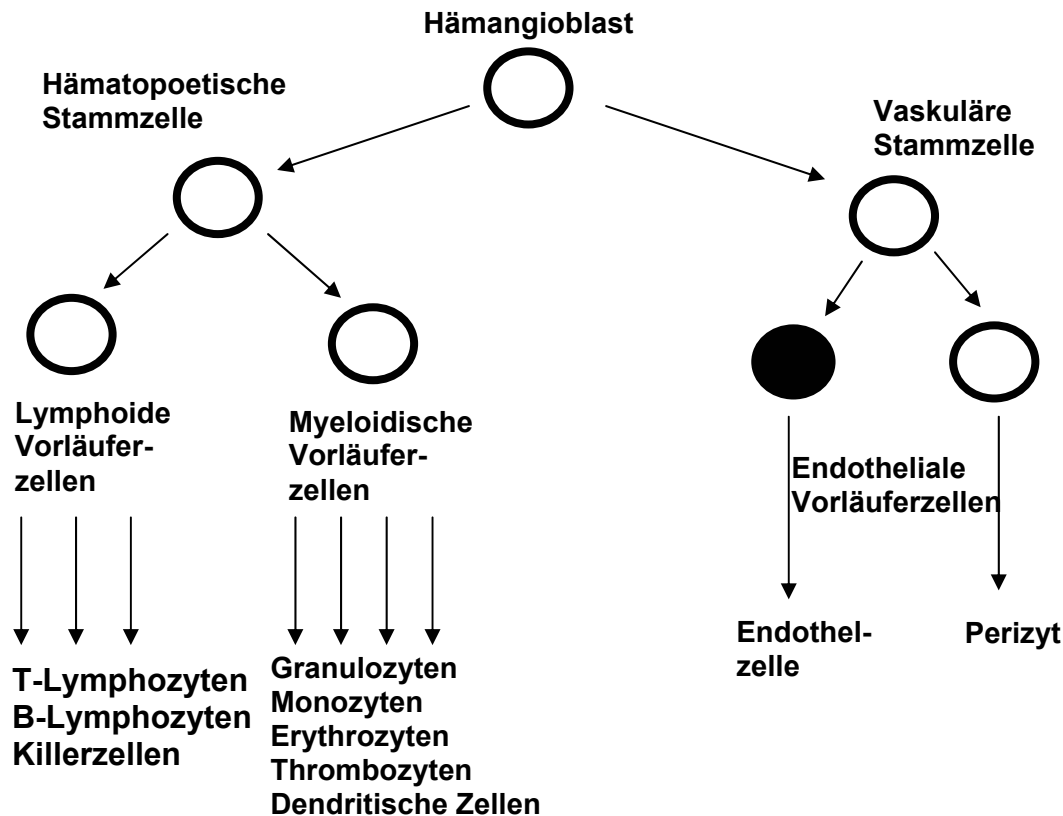


Abbildung 5: Stammzellen und Vorläuferzellen, die aus dem Hämangioblasten hervorgehen (modifiziert nach ASAHARA und KAWAMOTO, 2004)

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, war es wichtig, die Zellen im Blut bzw. Knochenmark anhand passender Marker differenzieren zu können. Die Schwierigkeit dabei liegt darin, dass die EPC und die hämatopoetischen Stammzellen in allen Entwicklungsphasen gemeinsame Oberflächenstrukturen aufweisen. PEICHEV et al. (2000) können zeigen, dass das Oberflächenantigen AC133 nur auf früh freigesetzten, aber nicht auf reifen EPC bzw. auf ausdifferenzierten, hämatopoetischen Zellen expremiert wird. Eine andere Studie gelangt durch Stimulationsversuche an AC133+ Zellen zu der gleichen Schlussfolgerung. Durch Zugabe von VEGF und einem anderen Zytokin entwickeln die AC133+-Zellen charakteristische Endotheloberflächenstrukturen (z.B. KDR und von Willebrandfaktor (vWF)) (GEHLING et al. 2000).

EPC, die gerade das KM verlassen haben, weisen AC113, CD34 und VEGFR-2 als Oberflächenstruktur auf, es fehlt aber die Expression von Cadherin und vWF. Wenn EPC sich länger im Kreislauf befinden, verlieren sie auf ihrer Oberfläche AC113 und bilden Vascular Endothelial (VE)-cadherin, platelet-endothelial-cell-adhesions-molecule-1 (PECAM-1), und vWF. CD34 und VEGFR-2 bleiben erhalten (HRISTOV et al. 2003).

2.6.3 Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten der endothelialen Vorläuferzellen

2.6.3.1 Allgemeines zu Vor- und Nachteilen

In den Medien wird viel über den Einsatz von Stammzellen berichtet. Dabei wird oft keine Unterscheidung zwischen embryonalen und adulten Stammzellen gemacht. Für die Forschung stellt dies allerdings eine wichtige Frage dar. Für den wissenschaftlichen Einsatz gibt es für beide Formen verschiedene Vor- bzw. Nachteile.

Als Vorteil für embryonale Stammzellen sprechen die Pluripotenz und die hohe Expansionrate der Zelle. Wohingegen ethische Gründe, Schwierigkeiten bei der Isolierung, eine obligatorische immunsuppressive Therapie, hohes Krebsrisiko und fehlende klinischen Daten über mehr als 25 Jahre vorhanden sind, als Nachteile zu nennen sind (BREHM et al. 2002, STRAUER und KORNOWSKI 2003).

Adulte Stammzellen weisen zahlreiche Vorteile auf. Unter anderem sind sie relativ leicht zu Gewinnen. Es bestehen keine ethischen Bedenken, sie sind hoch kompatibel, da autologe Transplantate keine immunsuppressive Therapie benötigen und sie weisen ebenfalls eine hohe Differenzierfähigkeit/Plastizität auf. Als einziger Nachteil sei der Mangel an spezifischen Oberflächenstrukturen zur Identifikation aufgeführt (BREHM et al. 2002, STRAUER und KORNOWSKI 2003).

2.6.3.2 Einsatz von endothelialen Vorläuferzellen

Die im Blut zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen spielen bei der Reendothelialisierung eine bedeutende Rolle. Im Tierversuch wird ihr Zusammenhang mit der Neointimbildung untersucht. Denn es ist bereits vom Menschen bekannt, dass je mehr Risikofaktoren einer KHK bei einem Patienten vorliegen, umso geringer die Anzahl der EPC in seinem Kreislauf ist. Wie ein klinischer Vergleich zeigt, sind bei Patienten, die bereits eine Vaskulopathie aufweisen, deutlich niedrigere zirkulierende EPC-Werte im Blut vorhanden als bei Gesunden (VASA et al. 2001a, SIMPER et al. 2003).

Um im Organismus eine genügend hohe Anzahl an Stammzellen bzw. Vorläuferzellen zu produzieren, gibt es zwei Wege: Die Stimulation körpereigener Zellen oder die Transfusion von ex vivo expandierten Zellen. Nach NAMIKI et al. (1995) bewirkt Hypoxie im Organismus eine erhöhte Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Durch die Applikation von VEGF können ASAHARA et al. (1999) eine erhöhte Freisetzung von EPC aus dem Knochenmark induzieren. In zwei weiteren Studien mit gentransfizierten VEGF wird das gleiche Ergebnis erzielt (KALKA et al. 2000 a und b).

TAKAHASHI et al. (1999) bewirken sowohl durch das Setzen einer Verletzung als auch die Gabe von Leukozyten-stimulierenden Faktoren eine Erhöhung der EPC-Zahl im Tiermodell. Dieser Zusammenhang wird ebenfalls in einer anderen Studie beobachtet. So führt die Applikation von Leukozyten-stimulierenden Faktoren nach einer Gefäßverletzung zu einer Verbesserung der Reendothelialisierung und dadurch zu einer Reduktion der Neointimahyperplasie (CHO et al. 2003).

In einer klinischen Studie erzielt die Applikation von Statinen eine Erhöhung der zirkulierenden EPC beim Menschen (VASA et al. 2001b).

Durch die Gabe von Statin kann eine schnellere Reendothelialisierung beobachtet werden, in dem mehr aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen freigesetzt werden und bei der Verletzung adhärieren können. Deshalb kann man nach der Ballonverletzung bei Statin-behandelten Ratten eine Reduktion der Intimahyperplasie beobachten (WALTER et al. 2002).

Wie VASA et al. (2001a) zeigen, steigt bei Frauen nach der Menopause die Zahl der kardiovaskulären Erkrankungen an. Im Tierversuch fällt bei Mäusen mit Östrogenmangel auch die Anzahl der zirkulierenden EPC im Blut ab und gleichzeitig kann eine wachsende Neointimabildung beobachtet werden. Durch die Gabe von Östrogen kann man dagegen eine ansteigende Zahl von EPC, eine beschleunigte Reendothelialisierung und damit eine Reduktion der Neointimahyperplasie erzielen. Denn Östrogene sind in der Lage, die Apoptoserate von EPC zu senken (STREHLOW et al. 2003).

Durch die In-vitro-Kultivierung von humanen EPC kann man somit eine höhere Anzahl erzielen und durch Isolierungsschritte einen hohen Grad an reinen Zellen erhalten (KALKA et al. 2000 b).

Zur Untersuchung der Reendothelialisierungsprozesse gibt es eine Reihe von Arbeiten, die durch Applikation von endothelialen Zellen deren Einfluss auf die Neointimahyperplasie erforschen. Es stellt sich aber als sehr schwierig dar, die einzelnen Studien und deren Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Der Grund liegt darin, dass die bei den Versuchen

applizierten, endothelialen Zellen von unterschiedlicher Herkunft sind und auch in unterschiedlichen Tiermodellen im Einsatz sind. Als Tiermodelle werden vor allem Kaninchen bzw. Ratten und dabei das Ballonverletzungsmodell eingesetzt. So können beim Kaninchen autolog, lokal transplantierte EPC nach Angioplastie der A. carotis communis die Neointimabildung reduzieren. Für die Gewinnung der EPC isoliert man aus peripherem Blut von Kaninchen mononukleäre Zellen. Diese werden für zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten. Dort differenzieren sie sich in endotheliale Zellen und werden dann direkt nach der Verletzung in das Gefäßlumen lokal appliziert. Durch einen zusätzlichen Gentransfer, der mit höherer NO-Produktion verbunden ist, kann sogar noch eine weitere Reduzierung der Neointimahyperplasie bewirkt werden (KONG et al. 2004).

In einer anderen Studie isoliert man ebenfalls mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von Kaninchen. Diese werden für 4 bis 5 Wochen in Endothelzellmedium in Kultur gehalten und direkt nach Ballonverletzung der A. carotis communis lokal transplantiert. Zum Vergleich erhält eine Gruppe von Kaninchen frisch isolierte mononukleäre Zellen. Als Ergebnis zeigt sich, dass die endothelialen Zellen durch schnellere Reendothelialisierung eine signifikante Reduktion der Neointima bewirken können. Dagegen zeigen die mononukleären Zellen keinen signifikanten Effekt (GULATI et al. 2004).

Zu einem recht widersprüchlichen Ergebnis kommen GRIESE et al. (2003 a und b). Zum einen beschreiben sie, dass die autologe Transplantation von EPC bei Kaninchen eine schnellere Endothelialisierung, und damit eine signifikante Reduktion der Neointima induziert. Dazu werden aus peripherem Blut mononukleäre Zellen isoliert und zwei bis drei Wochen kultiviert. Direkt nach der Ballonangioplastie der A. carotis erfolgt die lokale Applikation der differenzierten Zellen (GRIESE et al. 2003 b).

Bei einem Rattenversuch gelangen GRIESE et al. (2003 a) aber zu genau der gegenteiligen Aussage: Die lokale Transplantation von autologen, endothelialen Vorläuferzellen führt zwar zu einer beschleunigten Reendothelialisierung, es kommt aber zu einer gesteigerten Neointimabildung. Die differenzierten, endothelialen Zellen stammen dabei ursprünglich aus einer Mischpopulation, die sowohl aus peripherem Blut gewonnenen, mononukleären Zellen als auch aus Knochenmarkszellen zusammengesetzt ist. Als mögliche Erklärung für die vermehrte Neointimabildung führen sie an, dass die endothelialen Zellen sich bei der Applikation in einem aktivierten Stadium befunden haben. Diese Aktivierung wird durch die Expression eines Oberflächenantigens nachgewiesen. Dessen Funktion stellt die Leukozytenadhäsion dar. Durch die daraus resultierende Einwanderung (Migration) von Entzündungszellen könnten sie indirekt die Neointimahyperplasie unterstützen (GRIESE et al. 2003 a).

Bei angioplastierten Nacktratten kann nur nach Stimulation die Adhäsion von einer humanen mononukleären Zelllinie und damit die Verminderung der Neointimabildung beobachtet werden (FUJIYAMA et al. 2003).

Bei der Maus wird in der Regel eine Drahtverletzung durchgeführt, um eine Intimahyperplasie zu induzieren. In einem Versuch differenziert man aus der Milz gewonnene, mononukleäre Zellen in Endothelzellmedium zu endothelialen Zellen aus. Nach durchgeführter Drahtverletzung der A. carotis werden die Zellen direkt und 24 Stunden später intravenös verabreicht. Bei dieser Studie vergleicht man die Applikation von den differenzierten, endothelialen Zellen mit den frischen mononukleären Zellen. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass die mononukleären Zellen besser adhärieren und auch eine deutlich bessere Reduktion der Neointimabildung bewirken können als die endothelialen Zellen.

Man erklärt sich diesen Zusammenhang damit, dass die mononukleären Zellen sich aufgrund eines physiologischen „Cocktails“ im Blut zu endothelialen Zellen transdifferenzieren und vermutlich eine andere Oberflächenstruktur aufweisen als die in vitro kultivierten endothelialen Zellen (WERNER et al. 2003).

Endotheliale Vorläuferzellen sind auch an der Neovaskulogenese beteiligt. Nach Applikation dieser Zellen in einem Mausmodell zur Ischämieinduktion, können sie eine Verbesserung der Durchblutung aufgrund von Neovaskularisation bewirken. Eine ähnliche Studie an einem im Myokard induzierten Ischämiegebiet zeigt nach EPC-Transfusion Gefäßneubildung mit nachfolgend verbesserter Herzfunktion (KAWAMOTO et al. 2000).

Neovaskularisation und die damit verbundene Regeneration von beschädigten Geweben ist in vielen Tiermodellen z.B. bei der Hintergliedmaßenischämie der Maus, und der Myokardischämie der Maus oder der Ratte beschrieben (KALKA et al. 2000 b, JACKSON et al. 2001, KOCHER et al. 2001).

Eine am Menschen durchgeführte klinische Studie vergleicht die Effektivität von CD34-positiven endothelialen Zellen, die aus Knochenmark gewonnenen wurden, mit endothelialen Vorläuferzellen, die aus peripherem Blut gewonnenen wurden. Beide Gruppen zeigen eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion (ASSMUS et al. 2002).

2.6.3.3 Endotheliale Vorläuferzellen im Rahmen des Tumorgeschehens

Tumorstadium benötigt die Entwicklung einer weitreichenden Blutversorgung, um den Bedarf an Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren sicherstellen zu können. In normalem Gewebe wirken endogene Angiogeneseinhibitoren einer Angiogenese entgegen. Nach heutigem Wissen sind Tumore mit hoher angiogenetischer Fähigkeit ausgestattet und ihr Wachstum, ihre Infiltrationsneigung und ihre Metastasierung von der Angiogenese abhängig (RIBATTI 2004).

In einer Studie mit genetisch veränderten Mäusen untersuchen LYDEN et al. (2001) den Einfluss von VEGF auf die Tumorangio-genese. In dem sie VEGFR2 und VEGFR1 ausschalten, können sie die Blutgefäßbildung des Tumors blockieren und eine Nekrose induzieren. Andere Studien zeigen, dass in der Initialphase der Tumorangio-genese Endothelzellen aus den Nachbarzellen rekrutiert und für die weitere Entwicklung Vorläuferzellen benötigt werden. Der Anteil der EPC variiert dabei zwischen sehr gering (<0,1%) bis hoch (bis 50%) (RIBATTI 2004).

BAGLEY et al. (2003) führen in vivo und in vitro Studien durch. Auf Matrigelplatten können EPC in maligne Tumore eindringen und im Mausmodell eine Blutgefäßbildung bewirken.

In diesem Zusammenhang können EPC das ideale Zell-Basis-Modell darstellen, um durch genetische Modifikationen eine antiangiogenetische bzw. antineoplastische Therapie zu entwickeln (BAGLEY et al. 2003).

2.7 Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra)

2.7.1 Grundlagen zu IL-1ra

Ursprünglich bezog man sich bei dem Wort „Interleukin“ auf die molekularen Signalsubstanzen zwischen den Immunzellen. Die Bezeichnung „Cytokine“ ist zutreffender, da im Laufe der Zeit bekannt wurde, dass auch andere Zellen diese Signalstoffe produzieren und sezernieren (KOOLMAN 1994).

Bei Interleukin-1 muss man zwischen drei Genfamilien unterscheiden: IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra. IL-1 α und IL-1 β stellen hochinflammatorische Cytokine dar, die hauptsächlich von mononukleären Phagozyten aber auch von Endothelzellen freigesetzt werden. Sie lösen nicht nur Fieber aus, sondern haben eine Vielzahl von Auswirkungen auf endokrines Pankreasgewebe, Schilddrüse, Hypophyse-Epiphyse und KM-Stoffwechsel (DINARELLO 1995).

IL-1 α liegt in einem gesunden Organismus nur in intrazellulärer Form vor. Erst nach Zelltod im Rahmen von schwerwiegenden Erkrankungen kann IL-1 α im Blut nachgewiesen werden (DINARELLO 1995, WAKABAYASHI et al. 1991).

Auf die Gefäßwand hat IL-1 β nach CHAMBERLAIN et al. (1999) folgende Auswirkungen: Es hemmt das Endothelzellwachstum, wirkt prokoagulatorisch, fördert die Leukozytenadhärenz am Endothel, stimuliert Proliferation von vasculären SMC und sorgt für die Gefäßwandpermeabilität. Dagegen besitzt der IL-1ra eine nur rein antagonistische Wirkung. Von ihm existieren eine sekretorische Isoform (sIL-1ra) und drei intrazelluläre Isoformen (icIL-1ra1, icIL-1ra2 und icIL-1ra3). Indem er an die IL-1-Rezeptoren bindet, ohne dabei ein Signal zu transduzieren, hemmt er die beiden Agonisten (AREND und GUTHRIDGE 2000).

Von den Rezeptoren gibt es zwei Typen: IL-1RI und IL-1RII. Dabei löst nur eine Bindung von einem Agonisten an IL-1RI eine Signaltransduktion aus. IL-1RII stellt dagegen einen sogenannten „Decoy“-Rezeptor dar. Eine Bindung an diesen bleibt ohne Wirkung. Er übt damit eine hemmende Funktion auf zu große Menge an Interleukin-1 α und β aus (COLOTTA et al. 1993, DINARELLO 1995).

IL-1RI und IL-1RII können neben der membranständigen Form auch als „lösliche“, im Blut zirkulierende Rezeptoren fungieren. Sie dienen damit als eine Art Puffer, in dem sie überschüssige Interleukin-1-Bildung neutralisieren (DINARELLO 1995).

2.7.2 Bedeutung von IL-1ra im Zusammenhang der KHK

Nach ROSS (1999) spielt die Entzündung bei der Atherosklerose eine bedeutende Rolle. Im Carotismodell der Ratte zeigt sich nach Angioplastie, dass IL-1 β als erstes ansteigt, dann wieder abfällt. IL-1ra steigt etwas verzögert an, bleibt aber länger erhalten bevor es wieder abfällt (WANG et al. 2000).

IL-1ra scheint im Organismus noch andere Funktionen auszuüben. Bei IL-1ra-knock-out-Mäusen zeigte sich neben höherer Letalität unter bestimmten Erregern, ein deutlich geringeres Körpergewicht und ein insgesamt niedrigerer IL-1-Serumspiegel (HIRSCH et al. 1996).

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass das Gen für IL-1ra (IL-1RN) verschiedene Varianten aufweist. Dabei spielt das selten vorkommende Allel 2 eine wichtige Rolle (IL-1RN*2). FRANCIS et al. (1999) zeigen in einer Vergleichsstudie, dass dieses Allel mit der Eingefäßkrankheit, einer chronisch-entzündlichen Erkrankung assoziiert ist. Bei dieser Erkrankung beobachten sie in einer späteren Studie nach einem PTCA-Eingriff eine deutliche Reduktion der Restenoserate bei den Patienten (FRANCIS et al. 2001).

Mit ihren Genexpressionsanalysen gelingt DEWBERRY et al. (2000) der Nachweis, dass Endothelzellen mit Allel 2 im Genom, weniger intrazelluläres IL-1ra aufweisen. In einer späteren Studie können sie noch den Zusammenhang zwischen Proliferations- bzw. Lebensdauer von Endothelzellen und IL-1ra darstellen. Die IL-1RN*2-Zellen zeigen signifikant weniger Proliferation und die Anzahl der alternden Zellen steigt an. Durch Zugabe von exogenem IL-1ra ist ein deutlicher Anstieg der proliferierenden Zellen zu beobachten (DEWBERRY et al. 2003).

Bei IL-1ra-knock-out-Mäusen zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp nach einer Femoralisgefäßverletzung ein signifikanter Anstieg in der Neointimadicke (ISODA et al. 2003).

Eine Überdosierung von IL-1ra hat keine Nebenwirkungen. In einer Studie werden Probanden unterschiedlich geringe Mengen an IL-1 β appliziert. Bereits eine Dosierung von 1ng/kg i.v. löst das typische Entzündungssymptom Fieber aus (TEWARI et al. 1990).

Wird dagegen IL-1ra in einer bis zu 10 Millionen-facher Dosis (10 mg/kg i.v.) verabreicht, zeigt sich keine Wirkung bei gesunden Personen (GRANOWITZ et al. 1992).

2.8 Carotis–Verletzungsmodell

2.8.1 Die Ratte als Tiermodell

Die klinische Forschung am Menschen wird nach MULLER et al. (1992) durch folgende Punkte stark eingeschränkt:

1. Die Verfügbarkeit von ante mortem-Proben ist auch durch Biopsie über Katheter reduziert.
2. In klinischen Studien braucht man eine große Zahl von Patienten, das erfordert relativ hohe Kosten.
3. Von vielen Patienten fehlt eine komplette Angiographiereihe. Außerdem fehlt es an Übereinstimmung der Untersucher was die Definition der klinischen angiographisch ermittelten Restenose betrifft.

Tiere werden schon seit Jahrhunderten dazu verwendet, die menschliche Biologie besser zu verstehen. In der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen haben Tiermodelle das Studium der frühen Stadien, als auch die Erforschung der pathogenetischen Mechanismen und die Auswirkungen von Arzneimittelensätzen ermöglicht. Das Ziel dieser Studien ist es, ein klares Konzept zu entwickeln, das ausgewählte, ungefährliche Forschungen am Menschen ermöglicht (DOGGELL und BROWN 1998).

(Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um einen xenogenen Transplantationsversuch handelt, ist es von Bedeutung, dass die Tiere keine Abstoßung bzw. unerwünschte Reaktion auf die menschlichen Stammzellen zeigen. Derzeit gibt es zwei gebräuchliche Thymus-lose Tiermodelle: Maus und Ratte.)

Ischämiemodelle im Myokard und in den Hintergliedmaßen sind bei Mäusen bereits etabliert. Ebenso das Carotisligatur- bzw. das Femoralisverletzungs-Modell mit Draht (LINDNER et al. 1993, TANAKA et al. 2003, WERNER et al. 2003).

Die Nacktratte bietet in Bezug auf die Untersuchung über die Mechanismen der Endothelialisierung den Vorteil, dass sie größer ist als die Maus. Außerdem beschreiben FERNS et al. (1991) bereits genauer die Neointimabildung bei Nacktratten nach einer Ballondilatation. WALTER et al. (2002) und FUIJYAMA et al. (2003) benutzen dieses Verletzungsmodell ebenfalls an Thymus-losen Tieren, um die Wirkungsweise von humanen Knochenmarkszellen bzw. kurzkultivierten, endothelialen Vorläuferzellen zu untersuchen.

Auch im ischämischen Myokardmodell werden immundefiziente Tiere erfolgreich zur Untersuchung von humanen Stammzellen eingesetzt (KAWAMOTO et al. 2001, KOCHER et al. 2001).

2.8.2 Das Carotis-Verletzungsmodell bei der Ratte

Das Carotis-Ballonverletzungsmodell nach CLOWES et al. (1983 a und b) gilt als das Standard-Rattenmodell um SMC-Proliferation in vivo zu studieren. Aber bereits vor dem klinischen Einsatz der Angioplastie gab es experimentelle Restenosemodelle. Bei diesen wurde eine Endothelverletzung mit dem Ballonkatheter induziert, um die Antwort auf Gefäßverletzungen sowie SMC-Proliferation und Migration zu untersuchen (LAFONT und FAXON 1998).

Zwei Wochen nach einer Angioplastie entwickelt sich eine reine Neointimahyperplasie mit SMC-Proliferation und extrazellulärer Matrix (CLOWES et al. 1983 a).

Vergleicht man nun dieses Ballonverletzungsmodell mit anderen Verletzungsmodellen, so können FINGERLE et al. (1990) zeigen, dass das Abtragen von Endothelzellen mit einem monofilen Faden nur Thrombozytenadhäsion aber keine markante Neointimabildung induziert.

Ebenso bewirkt eine selektive und begrenzte Denudation mit einem feinen Draht nur eine geringe Proliferation der glatten Muskelzellen, die aber auch nur auf die Media begrenzt ist (CLOWES et al. 1989).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung und Gliederung des Gesamtprojektes

Die vorliegende Arbeit wird im Rahmen eines Großprojektes, das sich mit der therapeutischen Anwendbarkeit humaner, expandierter endothelialer Zellen bei KHK auseinandersetzt, durchgeführt.

Diese endothelialen Zellen, aus humanen CD34-positiven Zellen differenziert, sollen charakterisiert und ihr Wirkmechanismus untersucht werden. Die Besonderheit der hier eingesetzten humanen, endothelialen Zellen besteht darin, dass sie nicht nur kurzfristig kultiviert werden, sondern dass sie über mehrere Generationen hinweg langfristig expandiert wurden. Dieser Vorgang verhindert eine Verunreinigung mit anderen Zellen und gewährleistet somit einen hohen Grad an einheitlichen Zellen.

In dieser Arbeit wird die Fähigkeit der humanen, expandierten, endothelialen Zellen zur Reendothelialisierung am Carotis-Verletzungsmodell der Nacktratte, und in diesem Zusammenhang eine mögliche Reduzierung der Neointimabildung untersucht.

In der parallelen Arbeit von DOSS (in Vorb.) verfolgt man einen anderen möglichen Therapieansatz mit diesen humanen, endothelialen Zellen. Im Rahmen eines Myokardinfarktversuches wird ihre Fähigkeit zur Neovaskulogenese und deren funktionale Auswirkung untersucht.

In zahlreichen Studien belegt, spielt das Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle bei der Restenose. Der IL-1ra stellt in diesem Zusammenhang eine bedeutsame Funktion dar.

Durch viralen Gentransfer soll in endothelialen Zellen eine Überexpression von IL-1ra induziert werden. Parallel zu den IL-1ra-transfizierten Zellen vergleicht man das Verhalten von Zellen, die über das Virus nur mit dem leeren Plasmid ausgestattet sind. Damit kann überprüft werden, ob dieser Leervektor allein einen Effekt auf die endothelialen Zellen ausübt.

Durch die lokale Applikation dieser genveränderten Zellen bzw. Leervektorzellen kann der Effekt auf die Neointimaprolieration beobachtet werden.

Die Gewinnung der humanen, endothelialen Zellen und die Transduktion von IL-1ra mit einem retroviralen Vektor wird von der Kooperationsgruppe Oostendorp, III. Med. Klinik, und FISCHER (in Vorb.) durchgeführt.

Die operative Ausführung der Carotisverletzung in diesem Projekt erfolgt von einer tiermedizinischen Chirurgin der Experimentellen Onkologie und Chirurgie.

3.2 Ziel der eigenen Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe histomorphometrischer und immunhistochemischer Verfahren, die Effekte von humanen, expandierten endothelialen Zellen (EC) nach Gefäßwandverletzung bei der Ratte.

In den Vorversuchen soll ein geeignetes Verletzungsmodell etabliert werden, das sowohl eine Haftung der Zellen als auch eine deutliche Neointimabildung gewährleistet.

Dazu verwendet man als Nachweismethoden die Fluoreszenzmarkierung, die Evans Blue-Färbung und die immunhistochemische Färbung.

Im Hauptversuch werden insgesamt vier Gruppen anhand der ermittelten Parameter miteinander verglichen.

Die Histomorphometrie gibt Auskunft über den Grad der Neointimahyperplasie, indem man das Intima/Media-Verhältnis bestimmt. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den mit endothelialen Zellen behandelten Gruppen kann möglicherweise ein Unterschied ermittelt werden.

Mit der immunhistochemischen Untersuchung soll der Verbleib der Zellen bzw. das Proliferationsgeschehen in der Neointima beurteilt werden.

Die vorliegende Arbeit verfolgt mehrere Ziele: Sie versucht zum einen mehr über das Adhäsionsverhalten der EC zu erfahren, und geht anschließend der Frage nach, ob die EC, wenn sie adhärieren, über eine Reendothelialisierung eine Neointimabildung reduzieren können.

In einem weiteren Ansatz wird untersucht, welche Rolle in diesem Zusammenhang die Überexpression von IL-1ra spielt und welchen Effekt sie auf die Neointimaproliferation ausübt.

Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick auf den experimentellen Verlauf der vorliegenden Studie.

Tabelle 1: Schematischer Überblick über den experimentellen Verlauf der vorliegenden Studie

VORVERSUCH : Etablierung des Verletzungsmodells			
Vergleich Draht- und Ballonverletzung			
Ohne EC		Mit EC	
Histomorphometrie	Makroskopisch	Gefrierschnitt	Immunhistochemie an Paraffinschnitt
↓	↓	↓	↓
E.v.G.-Färbung	Evans Blue-Färbung	Fluoreszenzmarkierte Zellen	Etablierung der AK CD31 und Ki-67
↓	↓	↓	↓
Neointimabildung nach 14 Tagen	Endothelverletzung direkt nach der OP	Lokalisation	Lokalisation und Proliferation
↓↓↓↓			
Schlussfolgerung aus den Ergebnissen für den HAUPTVERSUCH: Angepasstes Verletzungsmodell Vier Gruppen (EC-, Kontroll-, Leervektor- und IL-1ra-Gruppe) werden folgenderweise analysiert:			
Histomorphometrie	Immunhistochemie	Immunhistochemie	
↓	↓	↓	
E.v.G.-Färbung	Verifikation mit CD31	Proliferationsmarker Ki-67	
↓	↓	↓	
Ausmessung der Neointima	Nachweis humaner Zellen im Tiermodell	Proliferationsverhalten	

E.v.G.: Elastica-van-Giesson

AK: Antikörper

EC: Endotheliale Zellen

CD 31: Oberflächenantigen

OP: Operation

IL-1ra: Interleukin-1-Rezeptorantagonist

Ki-67: Proliferationsmarker

3.3 Untersuchungsgut und Methodik

3.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuche werden an männlichen Thymus-losen RNU-Nacktratten (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Gesamtanzahl der Tiere beträgt $n=77$, davon sind 39 Gewebeproben auswertbar gewesen. Das Gewicht der Nacktratten liegt zwischen 180 und 310g.

Die Haltung der Tiere erfolgt im Tierbereich des Institutes für experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar. Die immunsupprimierten Ratten werden dabei im „Sterilbereich“ der Tierstallungen gehalten.

Die Luftfeuchtigkeit in diesem Areal beträgt $55 \pm 5 \%$ und wird konstant bei einer Raumtemperatur von 22 bis 23°C betrieben. Dort sind sie maximal zu zwei Tieren in einem Makrolonkäfig Typ III-erhöht (825 cm² Bodenfläche, Höhe 15cm, Breite x Tiefe oben 26,5 x 42cm, Breite x Tiefe unten 22,0 x 37,5cm) untergebracht. Die Käfige sind mit sterilem Fasereinstreu altromin® (von der Fa. Altromin, Lage, Deutschland) ausgestattet.

Die Tiere werden mit einem spezialbehandeltem Zuchtfutter für Ratten und Mäuse von altromin® versorgt, und erhalten Wasser ad libitum.

Der Zuchtbetrieb führt regelmäßig innerbetriebliche Gesundheitsuntersuchungen durch. Die Nacktratten werden dabei auf bakterielle, virale und parasitäre Erkrankungen untersucht. Eine gesunde Konstitution für die Durchführung der Versuche ist damit gewährleistet. Außerdem werden die Ratten über einen gewissen Zeitraum (in der Regel zwei Wochen) vor dem operativen Eingriff eingestallt, damit sie letztendlich stressfreier in die Versuche gehen können.

In den Operationsräumen des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München werden die Operation und die Organentnahme vorgenommen.

Die Fluoreszenzuntersuchung der Gefrierschnittpräparate wird in den Laborräumen der Experimentellen Kardiologie im Deutschen Herzzentrum München durchgeführt.

Die histologische Aufarbeitung der Paraffinpräparate erfolgt im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) vom 25.05.1998 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.3.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

3.3.2.1 Vorversuch

Methodenetablierung zur effektiven Anhaftung von humanen EC im Carotismodell an der Nacktratte. Validierung durch Fluoreszenz- und IHC-Nachweis, eine qualitative Analyse

Der Vorversuch besteht aus einer Kombination von mehreren Versuchen.

Um den Grad der Endothelverletzung beurteilen zu können, erfolgt bei zwei Tieren eine Evans Blue-Färbung direkt nach Verletzung der Arteria carotis communis (ACC).

Die linke ACC (ACCLI) der einen Ratte wird mit einem Draht, die ACCLI der zweiten mit einem F2 FOGARTY®-Embolektomiekatheter verletzt. Nach systemischer Blaufärbung der Tiere werden jeweils die ACCLI und die ACCRe als Kontrolle entnommen. Nur beschädigte Zellen sind in der Lage den blauen Farbstoff aufzunehmen.

Für den Vergleich zwischen Draht und Ballon(-Katheter) in Bezug auf Neointimahyperplasie werden bei zwei Tieren die ACCLI wieder unterschiedlich verletzt. Am 14. Tag post OP erfolgt die Tötung und Perfusionsfixation der Arterien. Diese Proben werden im Paraffinblock eingebettet, geschnitten und zur Beurteilung einer Elastica-van-Giesson (E.v.G.)-Färbung unterzogen.

Um das Adhäsionsverhalten der endothelialen Zellen untersuchen zu können, markiert man diese mit fluoreszierendem Farbstoff und appliziert sie direkt nach der jeweiligen Verletzung in das Lumen der ACC.

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen gibt es unterschiedliche Haltbarkeits- bzw. Nachweisdauer.

Die Tiere, die nach 24 Stunden getötet werden, erhalten Zellen, die mit dem kürzer haltbaren DiI markiert sind, und die, die 14 Tage post OP getötet werden den Farbstoff PKH26 als Zellmarker. Direkt nach Tötung und Perfusionsfixation werden die Proben eingefroren und histologisch aufgearbeitet.

Bei dem 24h-Versuch verletzt man jeweils drei Tiere mit Draht bzw. Ballon. Bei einem Tier bleibt die ACC unverletzt, erhält aber trotzdem Zellen um kontrollieren zu können, ob die Zellen nicht auch im unverletzten Endothel in der Lage sind, sich anzuhafte.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Aufgrund des Ergebnisses des 24h Versuches wird bei dem 14 tägigen Versuch auf die Ballonverletzung verzichtet. Zwei Tiere mit Draht verletzt und zwei zur Kontrolle unverletzte Tiere erhalten mit PKH26 gefärbte Zellen.

Tabelle 2: Fluoreszenznachweis der Zellen nach a) 24h und b) 14 d

Verletzung	Tierzahl	Zellen	Färbung	Zeit post OP
Ballon	n= 3	EC	DiI	24h
Draht	n= 3	EC	DiI	24h
keine	n= 1	EC	DiI	24h
Draht	n= 2	EC	PKH26	14d
keine	n= 2	EC	PKH26	14d

n: Anzahl

EC: Endotheliale Zellen

24h: 24 Stunden

14d: 14 Tage

DiI: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

PKH26: rotfluoreszierender Farbstoff

Die Tabelle 2 zeigt eine Übersicht auf den Ablauf des Teilversuches mit den Fluoreszenzmarkierten Zellen. Ziel der Untersuchung ist dabei, festzustellen, bei welcher Verletzung die lokal applizierten Zellen besser adhärieren können.

Der Nachweis für die Adhärenz von EC wird auch immunhistochemisch durchgeführt. Für diesen Zweck werden zwei Tieren nach vorangegangener Drahtverletzung EC lokal transplantiert. Das eine Tier wird nach 24h, das andere 3 Tage post OP getötet und die daraus gewonnenen Schnitte mit CD31 und Ki-67 gefärbt.

3.3.2.2 Hauptversuch

Transplantation von EC und transfizierten EC im modifizierten Carotis-Verletzungsmodell. Immunhistochemische und histomorphologische Auswertung

Im Hauptversuch werden alle Tiere an der linken ACC mit beiden Verletzungsarten behandelt, das heißt sowohl mit einem Draht als auch mit einem F2-Fogarty-Ballon.

Die Tiere erhalten jeweils nach Gruppeneinteilung direkt nach ihrer Verletzung EC, IL-1ra-transfizierte Zellen, nur mit Leervektor transfizierte Zellen oder ohne Zellen (Kontrolle).

Nach 14 Tagen werden die Tiere getötet und jeweils die ACCli und die ACCre entnommen.

Die Proben in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Zur histomorphometrischen Auswertung werden die Schnitte einer E.v.G.-Färbung unterzogen, fotografiert und ausgemessen.

Folgende Ausschlusskriterien gelten für die Gefäßschnitte: wenn das Gefäß gar keine Neointimabildung aufweist bzw. das Lumen komplett, homogen verschlossen ist.

Wenn diese Bedingungen auftreten, werden die Schnitte nicht zur Auswertung herangezogen.

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgt ebenfalls an Paraffinschnitten.

Der Antikörper CD31 soll die humanen Zellen im Rattenendothel nachweisen. Der Proliferationsmarker Ki-67 zeigt zum einen die mitotische Aktivität aller Zellen in der Neointima, damit aber auch gleichzeitig, ob die applizierten Zellen noch produktiv sind.

3.3.3 Versuchsvorbereitung

3.3.3.1 Zellkultur

Die für die Versuche verwendeten Zellen werden aus dem Nabelschnurblut neugeborener Kinder gewonnen. Über eine Magnetic-Cell-Sorting (MACS)-Säule werden die CD34-positive Zellen durch den Einsatz von immunomagnetischer Beads isoliert. Diese inkubieren auf Kulturplatten in Endothelzellmedium, die mit Fibronectin beschichtet sind.

In dem man mit Wachstumsfaktoren die CD34-positiven Zellen stimuliert, differenzieren sie sich in endotheliale Vorläuferzellen. Die Expression der charakteristischen Oberflächenantigene (CD34, VEGFR-1, VEGFR-2, CD31) wird durchflusszytometrisch und immunhistochemisch untersucht und nachgewiesen.

Die so gewonnenen endothelialen Zellen wachsen in beschichteten Zellkulturflaschen und erhalten ein spezielles Medium (Clonetics® EBM®-2, Endothelial Cell Basal Medium-2 (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA)). Diesem Grundmedium werden verschiedene Zusatzstoffe zugefügt.

3.3.3.2 Gentransfer-Leervektor-IL-1ra

Für den Gentransfer werden die CD34-positiven Zellen sofort, nachdem sie isoliert worden sind, transduziert. Der Vektor pLXSN, in den die cDNA des IL-1ra kloniert worden ist, wird in die endothelialen Zellen transduziert, damit eine Überexpression von IL-1ra in diesen Zellen erfolgt. Die transfizierten Zellen können leicht selektiert werden, da der Vektor pLXSN einen Promotor enthält, der die Expression eines Neomycinresistenzgens kontrolliert. Wachstum in neomycinhaltigem Milieu bedeutet erfolgreiche Transfektion.

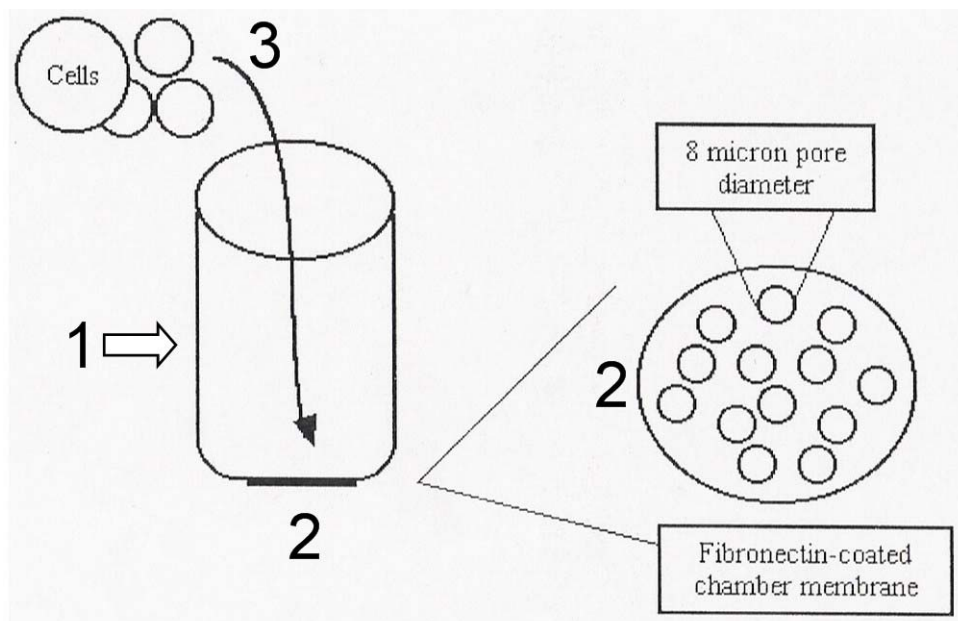
Zum Vergleich wird eine Gruppe mit Vektor pLXSN, der mit IL-1ra ausgestattet ist, und die andere Gruppe mit dem nackten Vektor pLXSN transfiziert.

Die Zellen, die sowohl mit Leervektor als auch mit IL-1ra transfiziert werden, entstammen einer Grundpopulation.

3.3.3.3 Quantitative Zellmigrationsuntersuchung

Zellmigration ist eine grundlegende Funktion aller normalen zellulären Prozesse und wird über eine Vielfalt von Faktoren gesteuert. Der CHEMICON QCM™-FN Assay (CHEMICON ® International, USA & Kanada) dient dazu, den Effekt von Pharmaka, Integrinen und Adhäsionsrezeptoren überprüfen zu können.

Das Boyden Chamber-System besteht aus einer Plastikvertiefung (siehe Abbildung 6 [1.]) die an einem Ende mit einer mit Fibronektin beschichteten Porenmembran (Porengröße durchschnittlich 8 µm) [2.] bespannt ist. In diese Vertiefung gibt man die zu untersuchenden Zellen [3.].



- 1: Plastikvertiefung
- 2: mit Fibronektin beschichtete Porenmembran
- 3: Zellen

Abbildung 6: QCM-FN Boyden Chamber (aus der Broschüre von CHEMICON QCM™-FN Assay)

Die Boyden Chamber selbst stellt man in 24-well Kulturplatten, die mit Medium und verschiedenen Stimulantien gefüllt werden. Über Nacht lässt man die Zellen migrieren und färbt am nächsten Tag die Zellen (siehe Abbildung 7), die sich auf der anderen Seite der Poren-

membran befinden. Diese Zellen werden dann gezählt. Der dabei ermittelte Wert entspricht der optischen Dichte und korreliert mit der Zellmigration.

In dem vorliegenden Versuch werden ca. 90 000 Zellen (Leervektor- und IL-1ra-Zellen) pro Vertiefung in EBM-2 Medium, das mit 10%igem fetalem Kälberserum versehen ist, verbracht. Zum Vergleich fügt man IL-1 β als Stimulanz hinzu.

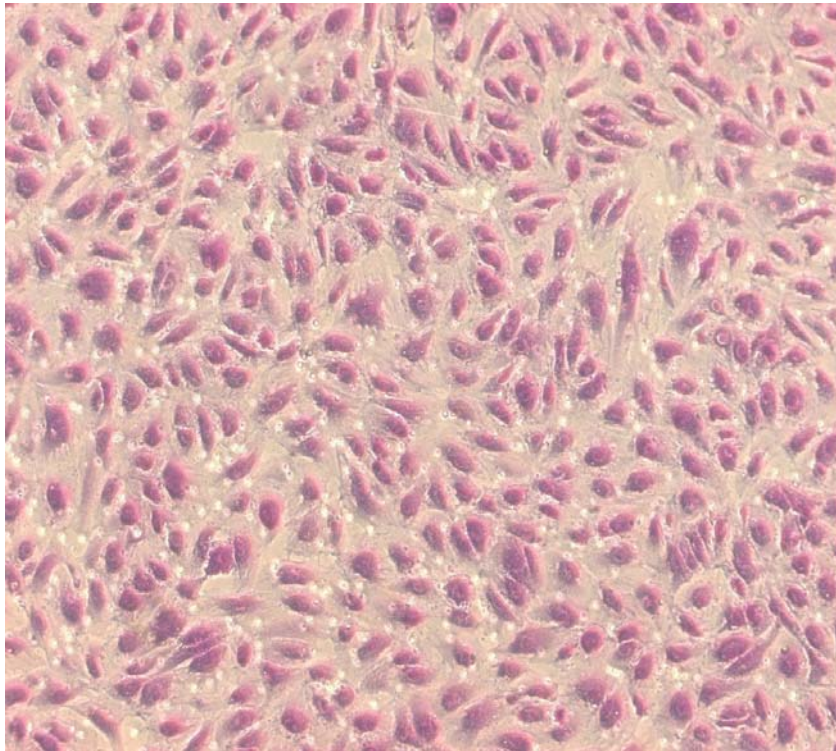


Abbildung 7: Gefärbte EC nach einem Migrationsversuch

3.3.3.4 Zellgewinnung und Fluoreszenzlabeling

Bevor man die Zellen mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch von der Flasche lösen kann, müssen diese mit der Pufferlösung HepesBSS gespült werden. Nach der Neutralisierung des Trypsins durch Trypsin-Neutralizing-Solution (TNS) wird auf der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro 1ml ermittelt. Bei der fünfminütigen Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen entsteht ein Zellpellet. Dieses wird nach Abnahme des Überstandes mit der erforderlichen Menge Spezialmedium (EBM-2 Medium ohne Zusätze in einer Verdünnung von 1:250 heparinisiert) auf die gewünschte Konzentration von 1 Mio. Zellen pro 150 μ l aufgefüllt.

Dieses Verfahren gilt für die Gewinnung von allen Zellen, die in den Versuchen für die Paraffinschnitte herangezogen werden. Für den Nachweis der Zellen in den Gefrierschnitten werden diese zusätzlich noch mit CellTracker™-DiI (Firma Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bzw. PKH26 gefärbt:

DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate):

Nach Abtrypsinieren und Zentrifugieren der Zellen wird das Zellpellet mit 10 ml PBS aufgeschwemmt und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Zur Herstellung der Stocksolution gibt man 50 µl DMSO auf 50 µg DiI. Die gewünschte Zielkonzentration beträgt 1,5 µg DiI/ml. Deswegen erfolgt die Zugabe von 15 µl Stocklösung zu den in 10 ml gelösten Zellen. Zuerst inkubieren die Zellen für 5 min bei 37°C, dann für 15 min bei 4°C. Als nächsten Schritt zentrifugiert man das Ganze für 5 min bei 1200 U/min, hebt den Überstand ab, wäscht die Zellen mit PBS und zentrifugiert erneut.

Wie oben bereits dargestellt, erfolgt die Verdünnung auf die gewünschte Endkonzentration.

Rotfluoreszierendes PKH26:

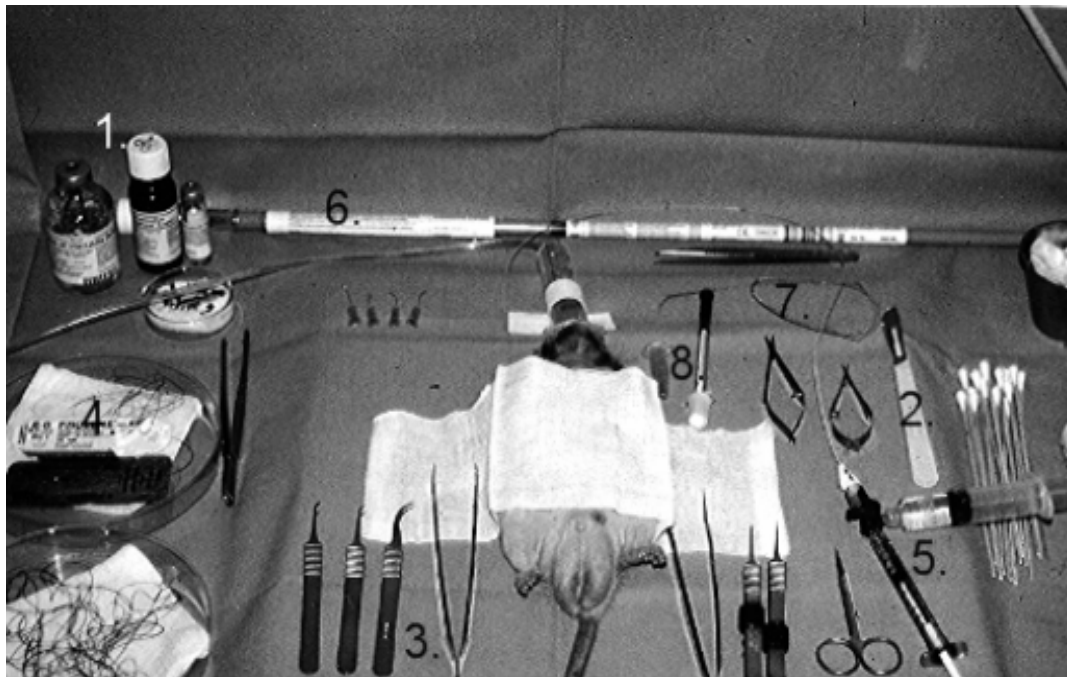
Der rotfluoreszierende Zellkit PKH26 (Fa. SIGMA, Missouri, USA, General Cell Membran Labeling), besteht aus einer PKH26 Grundlösung und einem Diluent C. Das gewonnene Zellpellet, mit bekannter Zellzahl, wird in 10 ml PBS aufgelöst und bei 1900 U/min für 25 min zentrifugiert. Das nun entstandene Zellpellet wird in 500 µl Diluent C aufgenommen und zu 500 µl 4-micromolarer PKH26-Grundlösung pipetiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 1 ml FCS und Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur. Durch Zufügen von 2 ml Medium ist die Lösung komplett. Nach 15 min Zentrifugation werden die Zellen noch einmal in 10 ml Medium gewaschen, bevor man sie auf das Endvolumen mit der gewünschten Zellkonzentration bringt.

3.3.4 Versuchsdurchführung

3.3.4.1 Anästhesie und operatives Vorgehen

Die Narkose erfolgt über die intramuskuläre Applikation der vollständig antagonisierbaren Anästhetika-Kombination (VAA) mit den Wirkstoffen Midazolam (DORMICUM® 2mg/kg KG), Medetomidin (DOMITOR® 0,15 mg/kgKG) und Fentanyl (FENTANYL® Janssen (0,005 mg/kg KG)). Die Narkosedauer beträgt 1,5 bis 2 Stunden.

Nach Eintreten des Toleranzstadiums wird die Ratte auf eine Wärmematte, die mit einem sterilen Tuch abgedeckt ist, auf den Rücken gelegt und im Nacken unterstützt. Zur Narkoseüberwachung wird an einem Hinterfuß ein Pulsoximeter (Nonin 8600V) befestigt. Um ein Austrocknen der Cornea während der OP zu verhindern, wird eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe) aufgetragen. Anschließend rasiert man das Operationsfeld und desinfiziert es mit einem Antiseptikum (Cutasept F®).



- | | | | |
|----|---------------|----|--|
| 1: | Narkosemittel | 5: | Heparin und NaCl-Spritze |
| 2: | Skalpell | 6: | Embolektomiekatheter |
| 3: | Pinzetten | 7: | Draht |
| 4: | Haltefäden | 8: | Endotheliale Zellen in einem Eppendorfgefäß und Insulinspritze |

Abbildung 8: Übersicht auf den Operationstisch und die verwendeten Materialien

Die Abbildung 8 zeigt eine Übersicht auf den Operationstisch.

Unter dem Dissektionsmikroskop erfolgt die Hautinzision mit einem Skalpell als Mittellinienschnitt der Halsregion vom Bereich der Insertionsstelle des M. masseter bis oberhalb des Manubrium sterni und man drängt stumpf die Muskelschichten auseinander. Die Speicheldrüsen werden vorsichtig anatomisch getrennt und zur Seite weggezogen. Anschließend präpariert man stumpf mit einer Nakajama-Pinzette die einzelnen Muskeln (M. sternohyoideus, M. sternothyroideus, M. digastricus (venter caudalis)) und den Zungenbeinast und umschlingt diese mit Haltefäden (USP 3/0 Vicryl®).

Nach stumpfem Präparieren und Darstellung der A. carotis externa (ACE) und den abgehenden Aa. thyroidea und occipitalis, wird die ACE bifurkationsnah angeschlungen und weit distal ligiert (USP 6/0 Prolene) (siehe Abbildung 9 [1.]).

Die A. thyroidea [2.] und die A. occipitalis [3.] werden ebenfalls permanent ligiert.

Nach einer durchgeführten Perkutanen Transluminaren Angioplastie (PTA) besteht die Gefahr einer Thrombosierung. Um diese zu verhindern, appliziert man 200 IE Heparin subkutan (s.c.). Gleichzeitiges Injizieren körperwarmer Ringer-Lösung s.c. dient dazu, entstehenden Blutverlust auszugleichen.

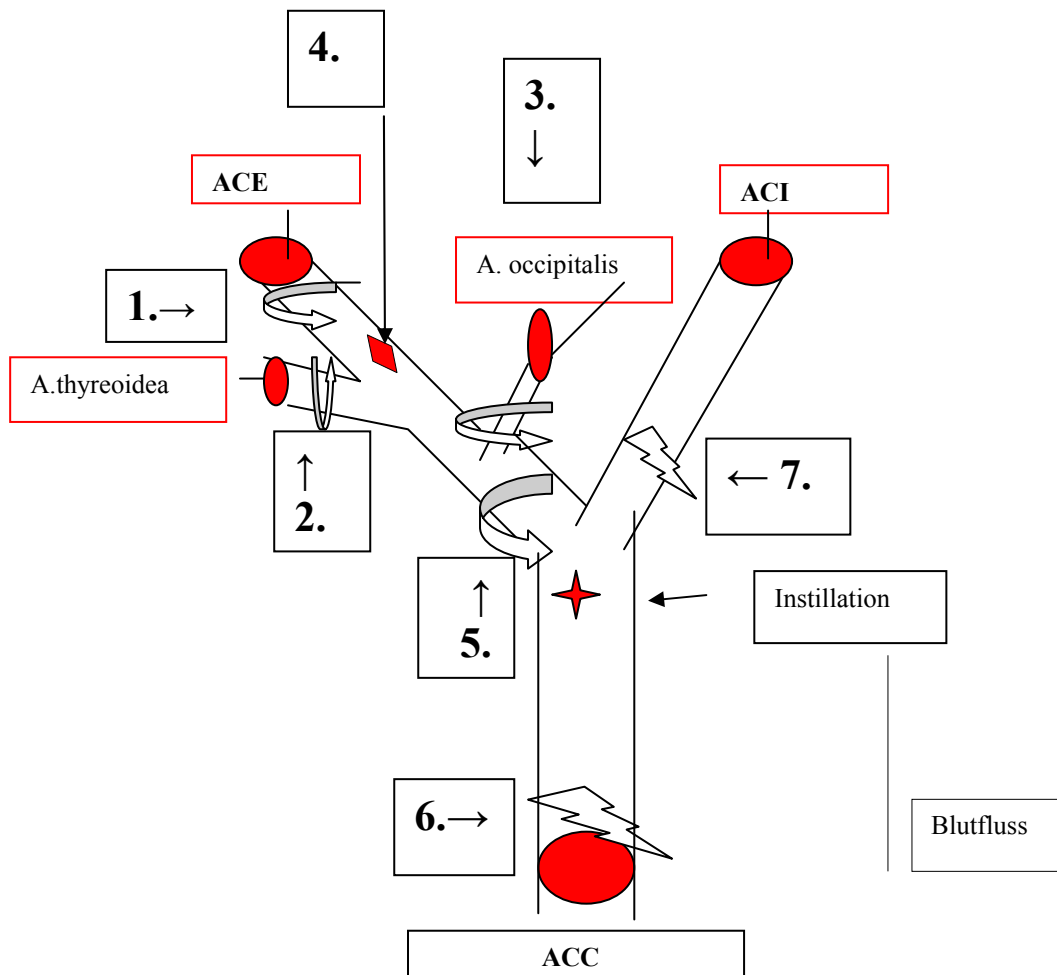
Die ACE wird nun durch das bifurkationsnahe Setzen einer Gefäßklemme temporär verschlossen. Nach Inzision mit einer Mikro-Schere in die ACE [4.], führt man in diese Öffnung einen 2F Fogarty® Embolektomiekatheter (Boston Scientific) bis in die proximale A. carotis communis (ACC) vor. Dort erfolgt die Inflation des Ballons. Insgesamt dreimal wird er in diesem Zustand von proximal nach distal bis in die ACE zurückgezogen. Dabei wird er jedes Mal, wenn er in die ACE gelangt, deflatiert und bis in die proximale ACC wieder vorgeführt. Dort erfolgt wiederum die Inflation und der Ballon wird wieder zurückgezogen. Vor dem Entfernen des Katheters deflatiert man den Ballon und führt in die gleiche Öffnung den Draht ein. Durch Vor- und Zurückschieben in der ACC setzt man ebenfalls eine Verletzung.

Nach der Entfernung des Drahtes erfolgt die permanente Ligation der ACE [5.].

Durch das Anbringen von zwei Gefäßklemmen, eine weit proximal an der ACC [6.] und die andere weit distal der A. carotis interna (ACI) [7.], erreicht man eine temporäre Unterbindung des Blutflusses.

Die Zellen, die einer Konzentration von 1 bis zu 3 Millionen pro 150µl Medium vorliegen, werden mit einer gebogenen Insulinspritze nahe der Bifurkation instilliert. Die Verweildauer der Zellen beträgt 20 Minuten, bevor im Anschluss der Blutfluss in der ACC und der ACI durch die Wegnahme der Klemmen wieder hergestellt wird.

Auftretende Blutungen werden durch Aufbringen eines Gewebeklebers vermieden. Es erfolgt nun das Kürzen der Ligaturen und das Entfernen der Haltefäden. Mit einem USP 4/0 Vicryl® näht man die Unterhaut fortlaufend und die Haut mit USP 3/0 Prolene® mit U-Heften.



ACC: A.carotis communis

ACI : A. carotis interna

ACE: A. carotis externa

1. Ligatur der ACE distal

2. Ligatur der A. thyroidea

3. Ligatur der A. occipitalis

4. Einschnitt in die ACE

5. Sitz der Gefäßklemme und später Ligatur der ACE proximal an der Bifurcation

6. Gefäßklemme an der ACC proximal

7. Gefäßklemme an der ACI distal

 Gefäßklemme


 Permanente Ligatur

Abbildung 9: Schema der Gefäßabgänge und Ligaturen nach Abschluss der PTA (modifiziert nach WEGENER, 2002)

Zur Antagonisierung der Narkose (VAA) wird die Dreifachkombination s.c. appliziert. Diese setzt sich aus den Wirkstoffen Flumazenil (Anexate® 0,2 mg/kg KG), Atipamezol (Antisedan® 0,75 mg/kg KG) und Naloxon (Narcanti® 0,12 mg/kg KG) zusammen.

3.3.4.2 Postoperative Behandlung

Um eine angemessene postoperative Analgesie zu erreichen, wird einmalig Buprenorphin (Temgesic® 0,1 mg/kg KG) s.c. verabreicht. Weitere Applikationen sind nicht notwendig, da die Schmerzhaftigkeit des Eingriffs als geringgradig angesehen werden kann.

Da nach der Buprenorphingabe eine Allophagie auftreten kann, sollten die Tiere für einen Tag ohne Einstreu eingestallt werden.

3.3.5 Bestimmungsmethoden

3.3.5.1 Probengewinnung

Zum jeweiligen Zeitpunkt werden die Tiere der Vor- und Hauptversuchsgruppe mit den oben genannten Injektionsanästhetika narkotisiert und mit einer Überdosis Pentobarbital bzw. Halothan euthanasiert. Nach Eintritt der Reflexlosigkeit erfolgt eine Thorakotomie. Dazu werden die Ratten in Rückenlage gebracht und nach einem Schnitt in Höhe des Sternums, wird die Haut stumpf abpräpariert. Zur Eröffnung des Brustkorbes durchtrennt man beidseits die Costalmuskeln und Rippen bis zur Claviculasehne. Das Sternum kann in cranialer Richtung umgelegt werden und freie Sicht in den Thorax gewähren. Der linke Ventrikel des Herzens wird nun mit einem blauen Butterfly kanüliert und der rechte Vorhof mit einem Scherenschlag reseziert. Der Butterfly-Schlauch ist an einen Drei-Wege-Hahn angeschlossen. Dieser wiederum ist durch zwei Schläuche mit zwei Perfusorspritzen, die NaCl und Paraformaldehyd enthalten, verbunden.

Zuerst erreicht man das Entbluten des Tieres durch Infusion von ca. 100 ml NaCl in den linken Ventrikel. Die Blutleere ist an der blassen Leber überprüfbar. Um die Integrität des Ge-

fäßes gewährleisten zu können, erfolgt im Anschluss eine Perfusionsfixation mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS. Dazu wird der Drei-Wege-Hahn des Schlauchsystems umgelegt und 40ml Paraformaldehyd-Lösung in die Ratte infundiert. Nach Freipräparieren der ACCli und ACCre, erfolgt deren Entnahme und die weitere Aufarbeitung.

3.3.5.2 Evans Blue-Färbung

Bei zwei Tieren des Vorversuches wird diese Färbung direkt nach der Verletzung durchgeführt. Evans Blue (direct Blue 53, E-2129, Lot 79H3632, Fa. SIGMA, Steinheim, Deutschland) liegt dabei als 5%ige Lösung in 50 ml PBS vor (CLOWES et al 1983 b).

Die Perfusion erfolgt in gleicher Weise wie oben genannt. Nur werden die Tiere mit 100 ml NaCl infundiert und anschließend die Evans Blue-Lösung perfundiert bis das ganze Tier blau angefärbt ist. Man entnimmt jeweils die rechte und linke Carotide. Diese werden dann der Länge nach vorsichtig aufgeschnitten und unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100, XE 3111, Zeiss, Jena) fotografiert.

3.3.5.3 Aufarbeitung der Gefrierproben

Um die fluoreszenzmarkierten Zellen bei den Tieren der Vorversuchsgruppe erkennen zu können, müssen die Proben wie folgt behandelt werden.

Nach Euthanasie und Präparation der A. carotis communis wird diese in Alufolie verpackt und durch sofortiges Einfrieren bei -70°Grad konserviert. Anschließend erfolgt die Einbettung in Tissue- Tek®, O.C.T (Optimal Cutting Temperature, Embedding Medium for Frozen Tissue Specimens to ensure, Fa. Sakura Finetek, Niederlande). Die Carotis wird dabei in drei Segmente geteilt, da der Abstand zwischen Messer und Haltevorrichtung in dem Kryotom (Mod. 2700-Frigocut, Fa. Reichert, Jung) nur eine bestimmte Höhe der Probe erlaubt. Vor dem Einsetzen in die Haltevorrichtung des Kryotoms wird das eingebettete Gefäß noch zusätzlich auf eine Korkscheibe fixiert, damit sie später wieder besser herausgenommen werden kann. Um eine optimale Stabilität des Einbettmediums und somit dünne Schnitte gewähr-

leisten zu können, beträgt die Temperatur in dem Kryotom etwa -20°C . Alle drei Segmente der Carotis werden komplett durchgeschnitten. Die Schnittdicke liegt zwischen 7 und 10 μm und die Schnitte werden auf SUPERFROST® PLUS Objektträger aufgetragen. Um den Fluoreszenzfarbstoff vor Licht zu schützen, werden die Objektträger danach in Alufolie eingeschlagen und sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, XE 3111, Zeiss, Jena) begutachtet und fotografiert.

3.3.5.4 Aufarbeitung der Paraffinschnitte

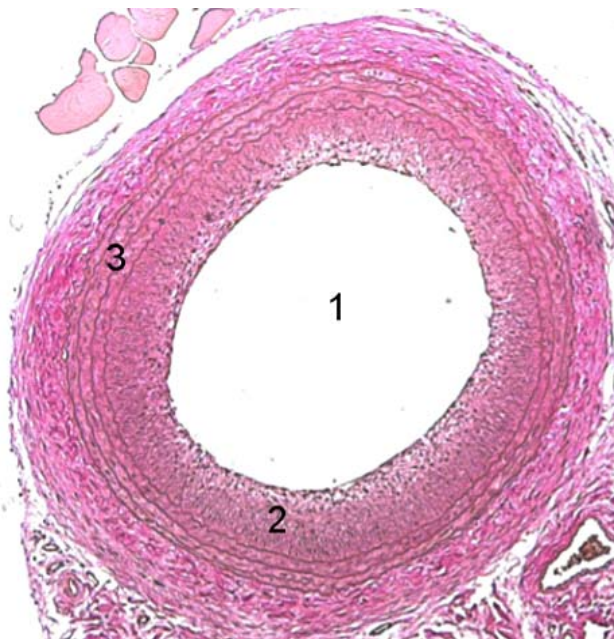
1. Die Gewinnung der A. carotis communis erfolgt wie unter 3.3.5.1 beschrieben. Diese wird durch Auftragen auf Filterpapier in Form gehalten und sofort in 4%igem Formalin fixiert. Nach 24 Stunden erfolgt das Einlegen in Einbettkapseln. Diese werden über Nacht entwässert und vorparaffiniert.
2. Die Präparate werden in flüssiges Paraffin (ca. 60°C) eingebettet und auf einer Kühlplatte abgekühlt („TBS 88 Paraffin Embedding System“: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, Fa.: MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany).
3. Am Rotationsmikrotom („Microm HM 335 E“, Fa.: MICROM GmbH, 69190 Walldorf, Germany) fertigt man die Schnitte mit einer Schnittdicke von $2\mu\text{m}$ an und streckt sie vor dem Aufziehen im Wasserbad („Paraffin Streckbad, TF 35“, Fa.: MEDITE Medizintechnik, 31303 Burgdorf, Germany)
4. Die Carotis wird mit einem Abstand von $100\mu\text{m}$ pro Ebene von proximal nach distal der ganzen Länge nach durchgeschnitten.
5. Die Schnitte einer Ebene werden zum einen auf SUPERFROST Objektträger aufgezogen, um nach einer Färbung mit E.v.G. zur histomorphologischen Untersuchung herangezogen zu werden. 5 Schnitte auf SUPERFROST Plus. Damit die Schnitte bei der immunhistochemischen Behandlung nicht Abschwimmen, bestreicht man vorher die Objektträger mit einer PRITT®-Kleber Mischung (1 Teil PRITT®-Bastellkleber Fa.: HENKEL, Düsseldorf und 2 Teile Poly-L-Lysine-Lösung, Fa: SIGMA DIAGNOSTICS INC., P.O. BOX 14508 St. Luis).

3.3.5.5 Histomorphometrische Auswertung

Bei allen Tieren der Hauptgruppe (n=22) wird pro Ebene ein Präparat mit E.v.G. gefärbt und mit dem Programm „AXIO VISION“ (ZEISS, Jena) fotografiert. An den dabei entstehenden Bildern erfolgt die morphometrische Ausmessung. Für die Bewertung werden die Daten im mittleren Abschnitt der Carotis herangezogen. Aus den drei höchsten Messwerten wird der Mittelwert bestimmt.

Mit dem „Sigma Scan Pro 5, Image Analysis Version 5.0.0.“ werden an einem Gefäßschnitt (siehe Abbildung 10) folgende Parameter ermittelt:

1. Fläche des Lumen (A Lumen [Pixel])
2. Fläche der Neointima (A Neo [Pixel])
3. Fläche der Media (A Media [Pixel])
4. Neointima/Media- bzw. abgekürzt: Intima/Media-Verhältnis



- 1: Lumen
- 2: Neointima
- 3: Media

Abbildung 10: Carotis einer Ratte mit Neointimahyperplasie, 5fache Vergrößerung

3.3.5.6 Immunhistochemische Untersuchung

An den unter 3.3.5.4 gewonnenen Schnitten wird die immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. Dabei kommen monoklonale Antikörper gegen humanen CD31 und Ki-67 zum Einsatz. Die Austestung erfolgt an einem Zellpellet (hergestellt aus humanen, endothelialen Zellen), bzw. proliferierendem Gewebe wie Darm und Haut der Ratte. Zur Überprüfung der Spezifität werden verschiedene Gewebeproben (Milz, Leber, Niere, Muskel) der Ratte als Negativkontrolle mitgefärbt.

Um eine Untersuchung zur Kolokalisation durchführen zu können, wird in der vorliegenden Arbeit eine Doppelfärbung etabliert. An einem Schnitt können somit zwei verschiedene Antikörper, gegen zwei unterschiedliche Antigene gerichtet, gleichzeitig eingesetzt werden. Der Antikörper gegen humanen CD31 weist die humanen Zellen im Rattengewebe nach und der Proliferationsmarker Ki-67 kann diese Zellen ebenfalls anfärben, wenn sie mitotisch aktiv sind. Diese Doppelfärbung kann folglich humane, proliferierende, expandierte endotheliale Zellen nachweisen.

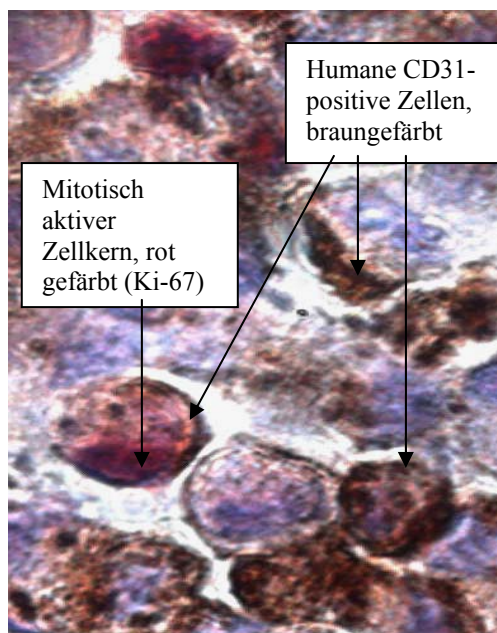


Abbildung 11: Doppeltgefärbte, humane endotheliale Zellen, 100fache Vergrößerung

Die Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt von einem aus humanen, expandierten endothelialen Zellen gewonnenen Zellpellet, das sowohl mit CD31 als auch mit Ki-67 gefärbt ist

3.3.5.6.1 Allgemeines zur Methodik

Um ein spezielles Antigen sichtbar machen zu können, kann man sich verschiedener Nachweismethoden bedienen. Bei der direkten Methode ist der Antikörper direkt mit einem Chromogen bzw. einem Markerenzym konjugiert, bei der indirekten Methode erst der Sekundär- bzw. Tertiärantikörper.

Die Labeled-Strept-Avidin-Biotin-(LSAB)-Methode stellt eine indirekte Methode dar. An den unkonjugierten Primärantikörper bindet im nächsten Schritt ein biotinylierter Brückenantikörper. Biotin, ein wasserlösliches Vitamin, besitzt eine hohe Affinität zu dem Glykoprotein Streptavidin. Im dritten Schritt wird nun das Streptavidin, das direkt mit einem Enzym (Horse-Radish-Peroxidase (HRP)) gekoppelt ist, zugefügt und bindet an das Biotin (siehe Abbildung 12).

Als letzter Schritt reagiert das Chromogen 3,3Diaminobenzidin (DAB) mit der Peroxidase und führt zu einer braunen Färbung.

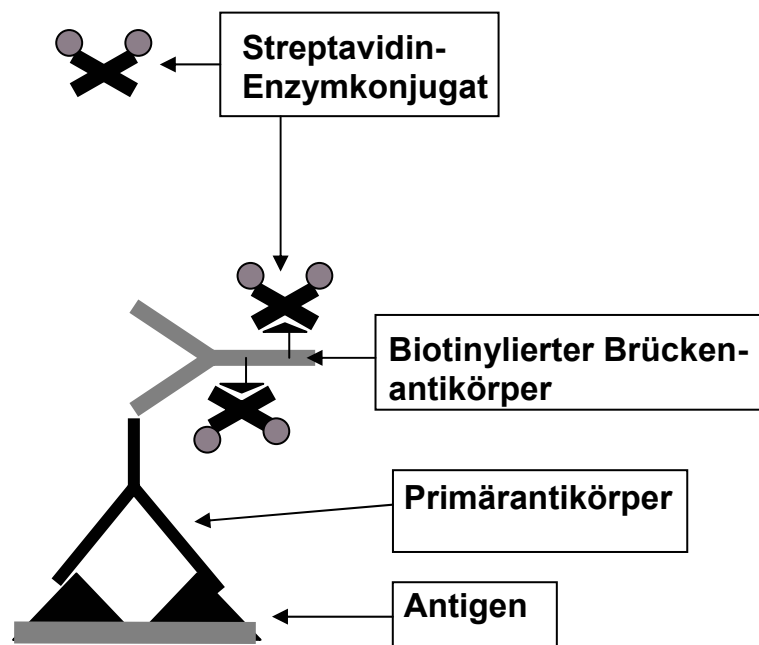


Abbildung 12: Schema der LSAB-Methode, dargestellt werden Primärantikörper, biotinylierter Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNEN, 2000)

Die Buchstaben der APAAP-Methode stehen als Abkürzung für Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase und weisen die gesuchten Antigene ebenfalls indirekt nach. Der APAAP-Komplex an sich besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern, die gegen alkalische Phosphatase gerichtet sind und gleichzeitig selbst mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt sind. Das Ganze stellt einen Enzym-anti-Enzym-Komplex dar. Primärantikörper, die aus der Maus stammen, werden über den Brückenantikörper mit dem APAAP-Komplex verbunden (siehe Abbildung 13). Wenn allerdings der Primärantikörper aus einer anderen Spezies (z.B. Kaninchen) gewonnen wurde, muss noch ein zusätzlicher Antikörper dazwischen geschaltet werden.

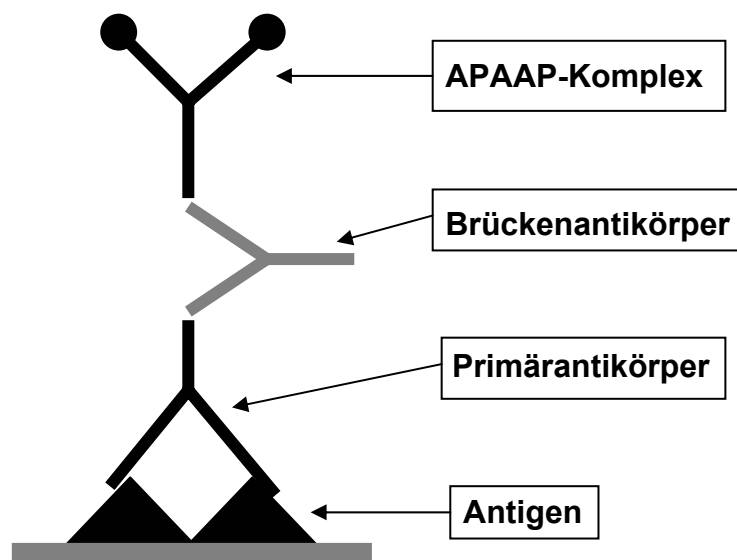


Abbildung 13: Schema der APAAP-Methode, dargestellt werden Primär- und Brückenantikörper, so wie der APAAP-Komplex (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNEN, 2000)

3.3.5.6.2 Arbeitsprotokoll der Immunhistochemischen Färbung

Die ersten Austestungen der Doppelfärbung sowie die alleinige Färbung mit humanem CD31 erfolgt als Handfärbung. Die restlichen Doppelfärbungen werden mit dem DakoCytomation-Autostainer durchgeführt.

Das folgende Protokoll beschreibt die Vorgänge bei der Doppelfärbung von CD31 (LSAB-DAB Methode) und Ki-67 (APAAP Methode):

Zur Vorbereitung für die Entparaffinierung werden die Schnitte über Nacht bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Am nächsten Tag stellt man die Objektträger dann in folgender Reihenfolge in die Reagenzien: in frisches Xylol für 2x 10min, in Isopropylalkohol für 2x 5min, in Ethanol 96% für 1x 5min, in Ethanol 70% für 1x 5min und anschließend in Aqua dest. abspülen.

Im nächsten Schritt erfolgt die Antigendemaskierung der Schnitte durch Kochen in 2l Citratpuffer (10 mmol, pH 6.0) in einem Dampfkochtopf für 7 Minuten.

Die Schnitte, die mit der LSAB-DAB Methode behandelt werden, müssen in 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 15 min blockiert werden.

Für die Dauer der Inkubation verbringt man die Objektträger in vorbereitete feuchte Kammern. Dies soll ein Austrocknen der Schnitte verhindern.

Die Lösung mit dem Primärantikörper wird entsprechend der Zielverdünnung mit Antikörper-Diluent (ChemMate™, Fa. DakoCytomation, Denmark) hergestellt und je 100µl pro Objektträger aufgebracht. Bei Raumtemperatur beträgt die Inkubationszeit 60 min.

Nach dieser Zeit werden die Schnitte dreimal mit TRIS-Puffer gespült.

Pro Objektträger trägt man ca. 200 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Fa. DakoCytomation, Denmark) auf und lässt ihn zwischen 25 und 30 min inkubieren.

Danach spült man wieder dreimal mit TRIS-Puffer.

Ebenfalls für 25 bis 30 min lässt man ca. 200µl des Streptavidin-Enzym (HRP)-Komplexes (ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Fa. DakoCytomation, Denmark) pro Objektträger inkubieren.

Vor dem Auftragen des Enzym-Substrat-/Chromogengemisches (ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Fa. DakoCytomation, Denmark) werden die Schnitte dreimal mit TRIS-Puffer gespült.

Pro Objektträger trägt man ca. 100 µl der Chromogenlösung (angesetzten nach Angabe des Herstellers) auf. Bei DAB beträgt die Inkubationszeit zwischen 5 und 10 min.

Anschließend werden die Schnitte dreimal mit TRIS-Puffer gespült und lässt sie dann bis zum nächsten Tag in dem TRIS-Puffer im Kühlschrank stehen.

Die Schnitte müssen mindestens eine halbe Stunde bevor man sie weiter behandelt, aus dem Kühlschrank genommen werden. Auf den zu kühlen Schnitten wäre die Reaktion des Antikörpers zu langsam, man müsste die Inkubationszeit sonst verlängern.

Der Primärantikörper (Ki-67) kann dann in seiner entsprechenden Verdünnung direkt aufgebracht werden. Es ist keine weitere Vorbehandlung nötig. Seine Inkubationszeit beträgt bei Raumtemperatur 60 min. Nach dreimaligem Spülen mit TRIS-Puffer wird der Brückenantikörper, Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline (ChemMate™ Detection Kit, APAAP, Fa. DakoCytomation, Denmark) aufgetragen. Ca. 200µl pro Objektträger und für 20 bis 30 min inkubiert.

Anschließend dreimal mit TRIS-Puffer gespült.

Im nächsten Schritt erfolgt das Aufbringen des APAAP-Komplexes (ChemMate™ Detection Kit, APAAP, Fa. DakoCytomation, Denmark). Pro Objektträger werden ca. 200µl Lösung aufgetragen, ebenfalls für 20 bis 30 min inkubiert und danach dreimal gespült.

Das Chromogengemisch (ChemMate™ Detection Kit, APAAP, Fa. DakoCytomation, Denmark) darf erst kurz vor dem Aufbringen hergestellt werden, da es nur für etwa eine halbe Stunde haltbar ist. Man verteilt 100µl der Fast Red-Lösung pro Objektträger und spült sie nach der Inkubationszeit von 9 min dreimal mit TRIS-Puffer.

Die Kerngegenfärbung erfolgt über ein Hämalun-Bad (1 min) und anschließendem Bläuen mit warmem Leitungswasser. In der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol werden die Präparate wieder entwässert.

Im Eindeckautomaten („Promountor“ RCM 2000 Coverslipping machine; Fa. MEDITE, 31303 Burgdorf, Germany) erfolgt das Eindecken der Schnitte. Zum Trocknen stellt man die Präparate für einige Minuten in den Brutschrank.

Die immunhistochemische Färbung kann jeweils auch separat durchgeführt werden, wenn man nur einen Antikörper einsetzen möchte. Bei der DAB-Färbung des CD31-Antikörpers kann man die Schnitte nach Abwaschen des Chromogens mit der Kerngegenfärbung weiterbehandeln und eindecken.

Der Antikörper Ki-67 benötigt als Vorbehandlung nur das siebenminütige Kochen. Aufgrund des Detektionssystems muss bei ihm nicht mit Wasserstoffperoxid geblockt werden.

Bei der Austestung der Immunhistologischen Färbung im DakoCytomation- Autostainer ergibt sich aufgrund der anderen Vorbehandlung und der maschinell erzeugten Kapillarkräfte eine unterschiedliche Verdünnung.

1. Entparaffinierung
2. Antigendemaskierung im Dampfgerar in TRIS-Puffer, pH 6,0 (DAKO® Target Retrieval Solution, USA).
Der Dampfgerar wird 20 min vorgeheizt. Die TRIS-Puffer-Lösung dabei in einem Mikrowellengefäß erhitzt. Dann gibt man die Schnitte in die Pufferlösung und erhitzt für weitere 30 min das Ganze. Anschließend entnimmt man das Mikrowellengefäß aus dem Dampfgerar und lässt die Schnitte noch für 10 min in dem heißen Puffer.
3. 3x Spülen mit Aqua dest.
4. Blocken mit 3%-iger Peroxidaselösung für 15 min.
5. 3x Spülen mit Aqua dest.
6. die Schnitte für mindestens 5 min in den speziellen Wash Buffer, DakoCytomation, geben, bevor diese in den Autostainer einsortiert werden.
7. Die Programmierung des Autostainers und Vorbereitung der notwendigen Reagenzien kann parallel zu Punkt 1. bis 6. erfolgen. Die Verdünnung des Antikörpers beträgt hier 1:1000. Allerdings werden die Objektträger vor der Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min mit einer Lösung geblockt. Diese besteht aus einer 4%igen Magermilchpulver-Lösung, der Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben wird. Der Primärantikörper wird in einer 2%igen Magermilchpulver-Antikörper-Diluent-Lösung angesetzt. Die Kit-Reagenzien, die bei 6., 8. und 10. beschreiben werden finden in unveränderter Form ihre Anwendung. Die Inkubationszeit des Antikörpers beträgt hier allerdings 50 min, der Sekundärreagenzien jeweils 25 min. Das Chromogengemisch wird 2x 5 min bei DAB bzw. 2x 8min bei APAAP auf die Objektträger aufgetragen.
8. Kerngegenfärbung geschieht ebenfalls in der Maschine durch aufbringen einer 1:4 verdünnten Hämatoxylinlösung für 5 min.
9. Nach Entnahme der Schnitte aus der Maschine erfolgen noch die letzten Schritte wie oben aufgeführt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die folgende Tabelle 4 stellt eine Zusammenfassung der Merkmale und Eigenschaften der benutzten Antikörper dar:

Tabelle 3: Übersicht zu den Antikörpern

Primärantikörper	CD31 Mouse anti human IgG1	Ki-67 Mouse IgG1
Firma	Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK	PharMingen
Austestung erfolgt an	Zellpellet, aus zentrifu- gierten EC, im Paraffin- block eingebettet	Darm und Haut von Ratte bzw. Zellpellet
Verdünnung der Handfärbung	1 : 75	1: 50
Verdünnung im Dako- Autostainer	1 : 1000	1 : 1000
Detektionssystem	LSAB-HRP	APAAP
Spezialbehandlung	H₂O₂,3%ig, zusätzlich Magermilchpul- ver und Ziegenserum im Autostainer	keine
Zu färbende Strukturen	Membranfärbung, Oberflächenantigen	Kernfärbung
Ziel der Anfärbung	nicht nur auf Endothel- zellen, sondern auch auf Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und B-Zellen expremiert.	Mitotisch aktive Zellen

CD 31:	Oberflächenantigen
Ki-67:	Proliferationsmarker
IgG1:	Immunglobulin G1
EC:	Endotheliale Zellen
LSAB-HRP:	Labeled-Strept-Avidin-Biotin-Methode, Horse-Radish-Peroxidase
APAAP:	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxidase

3.3.5.6.3 Immunhistochemische Auswertung

Die doppelt gefärbten Schnitte werden unter dem Lichtmikroskop bei 40facher Vergrößerung begutachtet. Zum einen wird die Zahl der braun gefärbten Zellen, das heißt die CD31-positiven humanen Zellen bestimmt und zum anderen die Zahl der rot gefärbten Zellen. Ihre Auswertung ergibt den Proliferationsindex der Proben.

3.3.5.7 Rechnerische Auswertung und Dokumentation

Für die statistische Auswertung des Hauptversuches wird das Statistik-Programm SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Die ausgewerteten Messungen sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen und damit annähernd normal verteilt. Die statistischen Unterschiede der Gruppen (Kontrolle vs EC bzw. IL-1ra vs Leervektor) berechnet man über den t-Test für unverbundene Stichproben. Von allen Ergebnissen werden die Mittelwerte (MW) und der Standardfehler (SEM) bestimmt.

Die Beurteilung der Werte erfolgt über die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit (p). Als statistisch signifikant gilt ein Wert, wenn $p < 0,05$.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

3.4.1.1 Verletzungsmodelle im Akut-Vergleich

Zur Untersuchung über den Zustand des Endothels nach verschiedenen Verletzungsmodellen (Draht und Ballon) wird an den Gefäßen die Evans Blue-Färbung durchgeführt. Die folgenden Abbildungen stellen das Ergebnis der Färbung direkt nach der Verletzung der A. carotis communis dar:



Abbildung 14: linke A. carotis communis mit Drahtverletzung nach Evans Blue-Färbung (Schwarz-Weiß-Aufnahme)

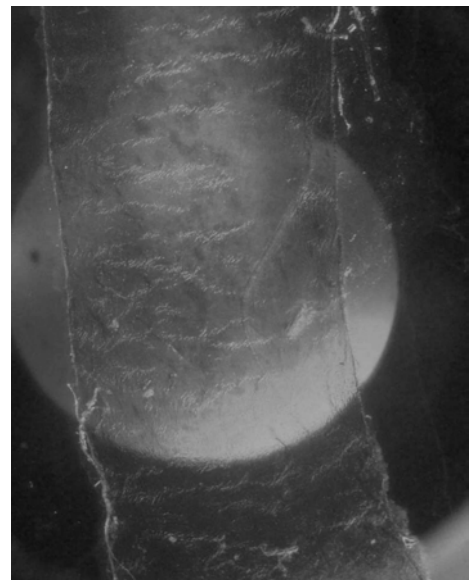


Abbildung 15: linke A. carotis communis mit Ballonverletzung nach Evans Blue-Färbung (Schwarz-Weiß-Aufnahme)

Der Denudationsbezirk bei der Drahtverletzung in Abbildung 14 ist als deutlicher Streifen erkennbar. Die übrige Endotheloberfläche erscheint intakt. Trotz dreimaliger Hin- und Herbewegung des Ballons, scheint das Endothel in Abbildung 15 nicht so tief greifend verletzt zu sein. Auf eine Abbildung der Kontrolle wird verzichtet. Zwischen Kontrolle und Ballonverletzung ist makroskopisch kein Unterschied feststellbar. Der Draht führt zu einer tieferen Endothelverletzung.

3.4.1.2 Verletzungsmodelle im Langzeit-Vergleich

Um zu untersuchen, welches Verletzungsmodell eine Neointimahyperplasie induzieren kann, wird ein Tier mit Draht, das andere mit Ballon verletzt. Nach 14 Tagen werden die Tiere geopfert und die Carotiden histologisch aufarbeitet. Die Ergebnisse der nach Elastica-van-Giesson (E.v.G.) gefärbten Paraffinschnitte zeigen die folgenden Abbildungen:



Abbildung 16: linke ACC mit Drahtverletzung nach 14 Tagen, E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung

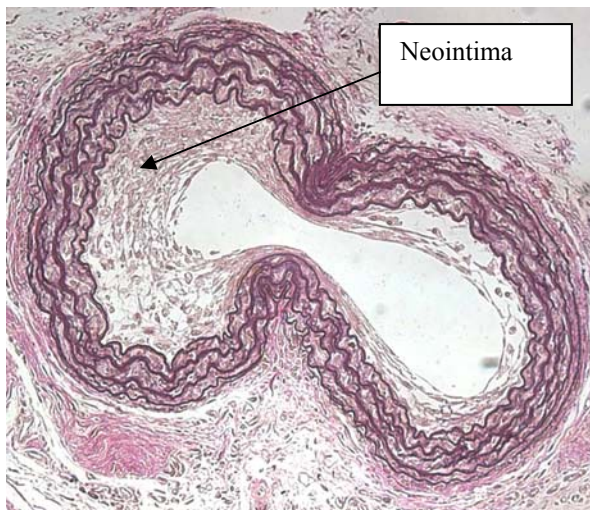


Abbildung 17: linke ACC mit Ballonverletzung nach 14 Tagen, E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung

Nach 14 Tagen zeigt sich nur in Abbildung 17 bei der Ballonverletzung eine Neointimbildung. Das Gefäß in Abbildung 16 weist nach einer Drahtverletzung dagegen keine Veränderungen auf. Nur die Ballonverletzung ist in der Lage eine reproduzierbare Neointimbildung zu bewirken.

3.4.1.3 Nachweis der endothelialen Zellen (EC) mit Fluoreszenzfärbung

Die folgende Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse über das Adhäsionsvermögen der Fluoreszenz-markierten Zellen im Vergleich zwischen den beiden Verletzungsarten Draht und Ballon, bzw. im unverletzten Gefäß. Die Zellen der 14-Tages-Tiere werden mit dem Fluoreszenz-farbstoff PKH26-markiert, da er eine längere Nachweisbarkeit als der DiI-Farbstoff aufweist.

Tabelle 4: Ergebnisse der Auswertung der Gefrierschnitte im Fluoreszenzmikroskop

Verletzung	Tierzahl	Zellen	Zeit post OP	Färbung	Ergebnis
Ballon	n= 3	EC	24h	DiI	negativ
Draht	n= 3	EC	24h	DiI	positiv
keine	n= 1	EC	24h	DiI	negativ
Draht	n= 2	EC	14d	PKH26	positiv
keine	n= 2	EC	14d	PKH26	negativ

n: Anzahl
 EC: Endotheliale Zellen
 OP: Operation
 24h: 24 Stunden
 14d: 14 Tage
 DiI: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
 PKH26: rotfluoreszierender Farbstoff

Die Fluoreszenz-markierten Zellen sind bei der Drahtverletzung sowohl nach 24 Stunden als auch nach 14 Tagen nachweisbar. Bei den unverletzten und den mit Ballon verletzten Gefäßen zeigt sich keine positive Fluoreszenz. Die Zellen können nicht anhaften. Nachdem sich bei den 24-Stunden-Tieren keine Zellen nach der Ballonverletzung angehaftet haben, wird bei den 14-Tages-Tieren auf eine Ballongruppe verzichtet.

Die folgenden Abbildungen 18 und 19 verdeutlichen den Unterschied zwischen positivem und negativem Ergebnis.



Abbildung 18: PKH26-gelabelte Zellen, 14 Tage nach Drahtverletzung

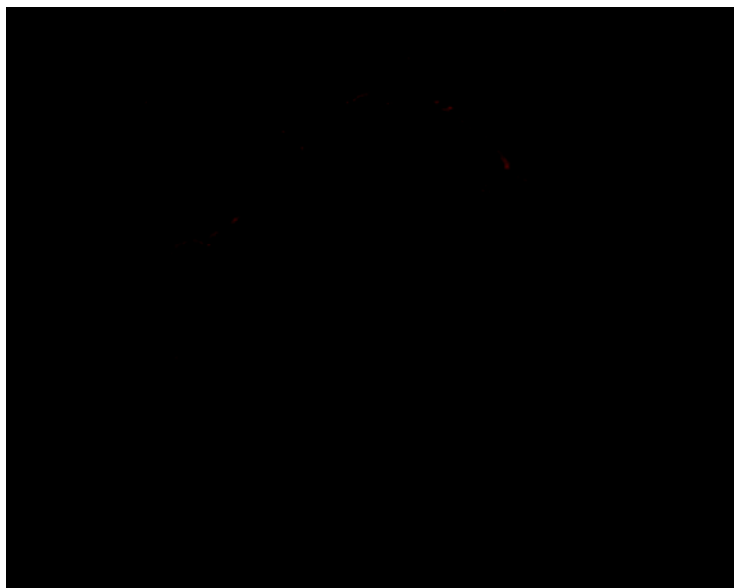


Abbildung 19: Kontrolle nach 14 Tagen

Abbildung 18 zeigt die rotfluoreszierenden Zellen in der Zellwand, die sich nach der Drahtverletzung in dem begrenzten Gebiet angehaftet haben. Bei dem ballonverletzten bzw. unverletzten Gefäß (Abbildung 19) ist keine Fluoreszenz nachweisbar. Die Zellen können hier nicht adhärieren.

3.4.1.4 Immunhistologischer Nachweis der Zellen im Paraffinschnitt

An Gefrierschnitten kann die Gefäßwandstruktur nicht so gut wie an Paraffinschnitten beurteilt werden. Die Etablierung des Antikörpers gegen humanen CD31 ermöglicht auch den Nachweis der lokal applizierten humanen, endothelialen Zellen im Paraffinschnitt.

Einem Tier werden direkt nach durchgeführter Drahtverletzung die Zellen transplantiert. Nach 24 Stunden erfolgen die Opferung und die Entnahme der Carotis. Die in Paraffin eingebettete Probe wird geschnitten, und nach entsprechender Vorbehandlung werden auf den Schnitten die Antikörper gegen humanen CD31 inkubiert und mit der LSAB-DAB-Methode nachgewiesen.

Das Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung zeigt sich auf der Abbildung 20. In dem begrenzten Bereich (markiert von den Pfeilen) befindet sich das Gebiet der braungefärbten, CD 31-positiven Zellen. Die Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt unter 100facher Vergrößerung aus diesem Bereich.

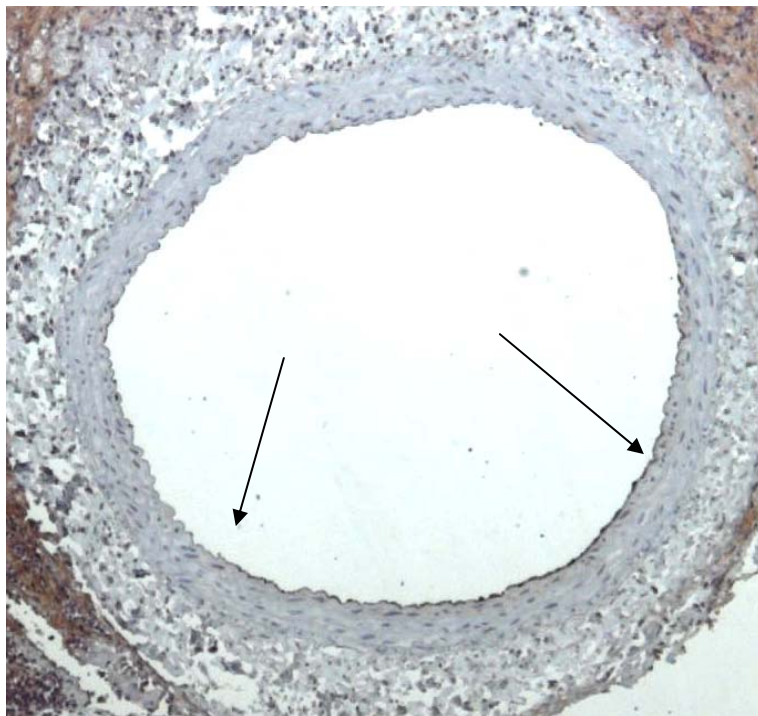


Abbildung 20: Übersichtsbild, Carotis 24 Stunden nach Drahtverletzung und Applikation von humanen, endothelialen Zellen, DAB-Färbung, 5fache Vergrößerung

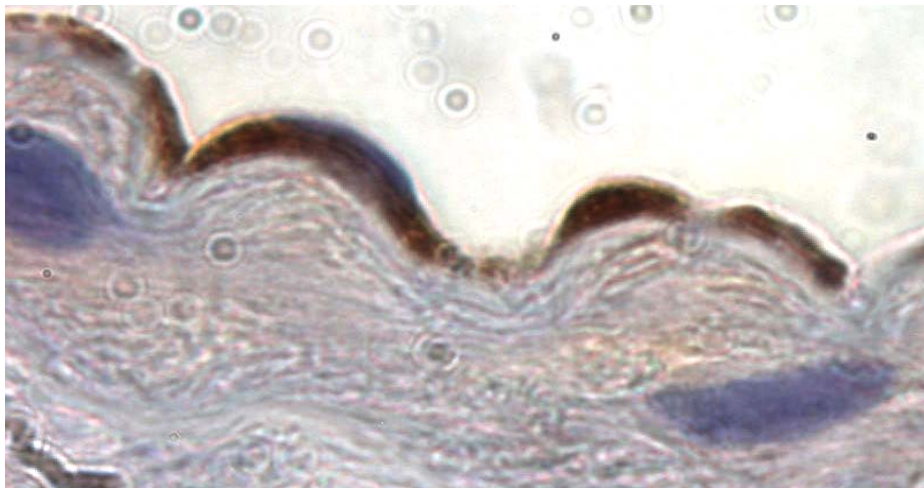


Abbildung 21: Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 20, 100fache Vergrößerung

Die Ergebnisse des Vorversuches lassen sich kurz zusammenfassen:

Wie die Ergebnisse der Evans Blue-Färbung, der Fluoreszenznachweis und der immunhistologische Nachweis deutlich zeigen, können die lokal applizierten, humanen, expandierten endothelialen Zellen (EC) nur bei der Drahtverletzung adhärieren.

Die Ballonverletzung dagegen erzeugt zwar eine Neointimahyperplasie in der Carotis, aber die Zellen können bei diesem Verletzungsmodell nicht adhärieren.

Für den folgenden Hauptversuch werden beide Verletzungsmodelle kombiniert eingesetzt.

Die Drahtverletzung führt dabei zu einem Anhaften der Zellen und die Ballonverletzung induziert eine Neointimahyperplasie. Durch Auszählung der proliferierenden Zellen und der Ausmessung der Neointima im Hauptversuch wird nun überprüft, welche Effekte die verschiedenen Zelltypen im Vergleich zur Kontrolle bewirken.

3.4.2 Ergebnisse des Hauptversuches

Während im Vorversuch keine Ausfälle zu beobachten und alle Proben auswertbar sind, zeigt sich im Hauptversuch eine Ausfallsrate von ca. 5 %. Diese Tiere versterben intraoperativ aufgrund von zu starkem Blutverlust.

Von insgesamt 57 Proben sind nur 22 auswertbar. Bei 9 Proben zeigte sich keine Neointimbildung und 26 Proben weisen einen kompletten Gefäßverschluss auf.

Die Tabelle 5 gibt wieder, wie viele Proben in der jeweiligen Gruppe zur histomorphometrischen und zur immunhistochemischen Untersuchung herangezogen werden können.

Tabelle 5: Anzahl der auswertbaren Proben der Hauptversuchsgruppe

Hauptversuch n= 22	Jeweils Histomorphometrie und Immunhistochemie
EC	n= 6
Kontrolle	n= 6
IL-1ra	n= 5
Leervektor	n= 5

n: Anzahl

EC: Endotheliale Zellen

IL-1ra: Interleukin-1-Rezeptorantagonist

3.4.2.1 Histomorphometrische Auswertung der EC- und der Kontrollgruppe

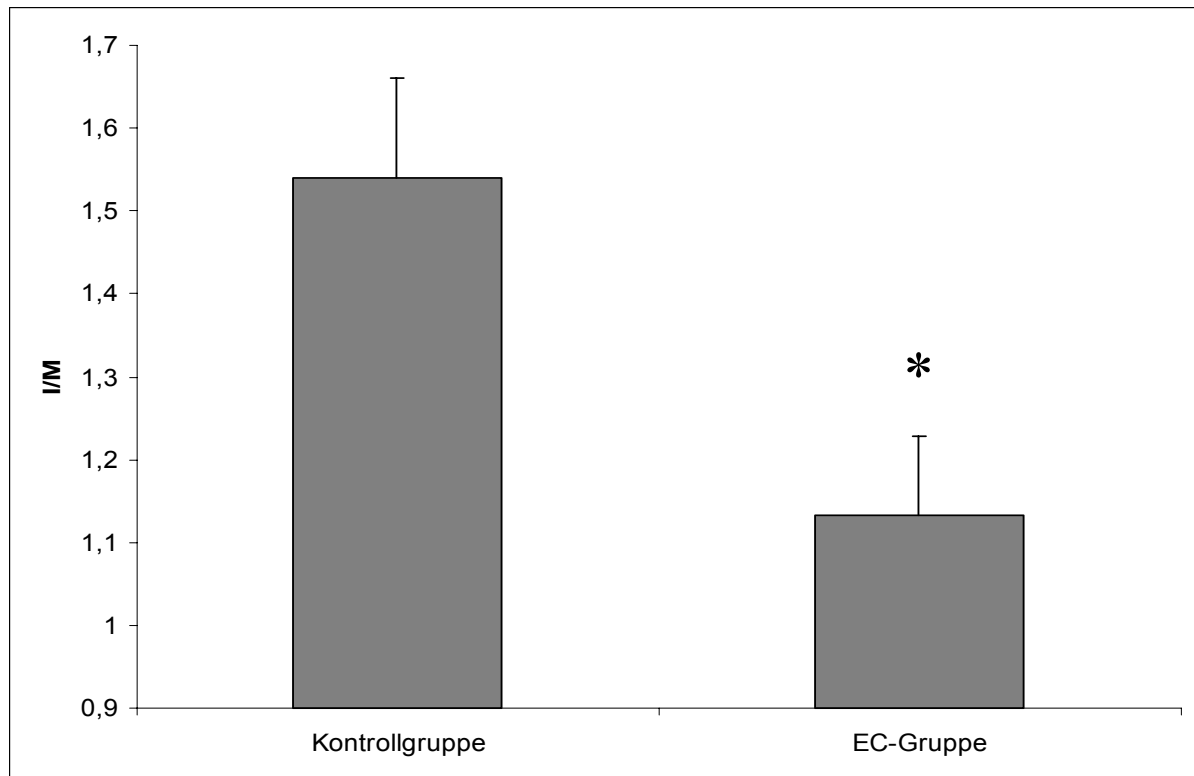
Die mit E.v.G. gefärbten Schnitte werden ausgemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Aus den Flächen der Neointima und der Media kann man das Intima/Media-Verhältnis berechnen und die beiden Gruppen miteinander vergleichen.

Tabelle 6: Ergebnisse der EC- und der Kontrollgruppe

Tier	Intima (Fläche in Pixel)	Media (Fläche in Pixel)	I/M
EC	106 824,667	76 664,667	1,393
EC	66 401,000	57 823,667	1,148
EC	108 872,000	91 651,667	1,188
EC	68 297,000	99 035,333	0,690
EC	48 898,000	39 140,667	1,249
EC	89 026,667	79 023,333	1,127
MW	81 386,611	73 889,888	1,133
SEM	9 852,782	9 032,271	0,097
Kontrolle	95 589,667	59 737,333	1,600
Kontrolle	97 563,667	71 799,667	1,359
Kontrolle	145 903,333	70 301,667	2,075
Kontrolle	114 943,667	74 970,667	1,533
Kontrolle	90 606,000	73 536,333	1,232
Kontrolle	133 810,000	92 731,333	1,443
MW	113 069,556	73 846,166	1,540
SEM	9 241,822	4 373,484	0,119
p-Wert	0,032	0,996	0,009
Signifikanz	s.	n.s.	s.

I/M:	Intima/Media-Verhältnis	n.s.:	nicht signifikant
EC:	Endotheliale Zellen	s.:	signifikant
p-Wert:	Irrtumswahrscheinlichkeit	MW:	Mittelwert
SEM:	Standardfehler		

3.4.2.2 Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses der EC- und der Kontrollgruppe



I/M: Intima/Media-Verhältnis

EC: Endotheliale Zellen

Abbildung 22: Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses von der EC- und der Kontrollgruppe

In Abbildung 22 ist die signifikant niedrigere EC- Gruppe mit einem * gekennzeichnet. Um diesen Unterschied besser verdeutlichen zu können, beginnt die y-Achse erst bei dem Intima/Media-Wert von 0,9. Das Intima/Media-Verhältnis liegt mit 1,54 bei der Kontrollgruppe höher als bei der EC-Gruppe mit einem Verhältnis von 1,13.

Die lokale Transplantation von EC führt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung.

3.4.2.3 Histomorphometrische Auswertung der IL-1ra- und der Leervektorgruppe

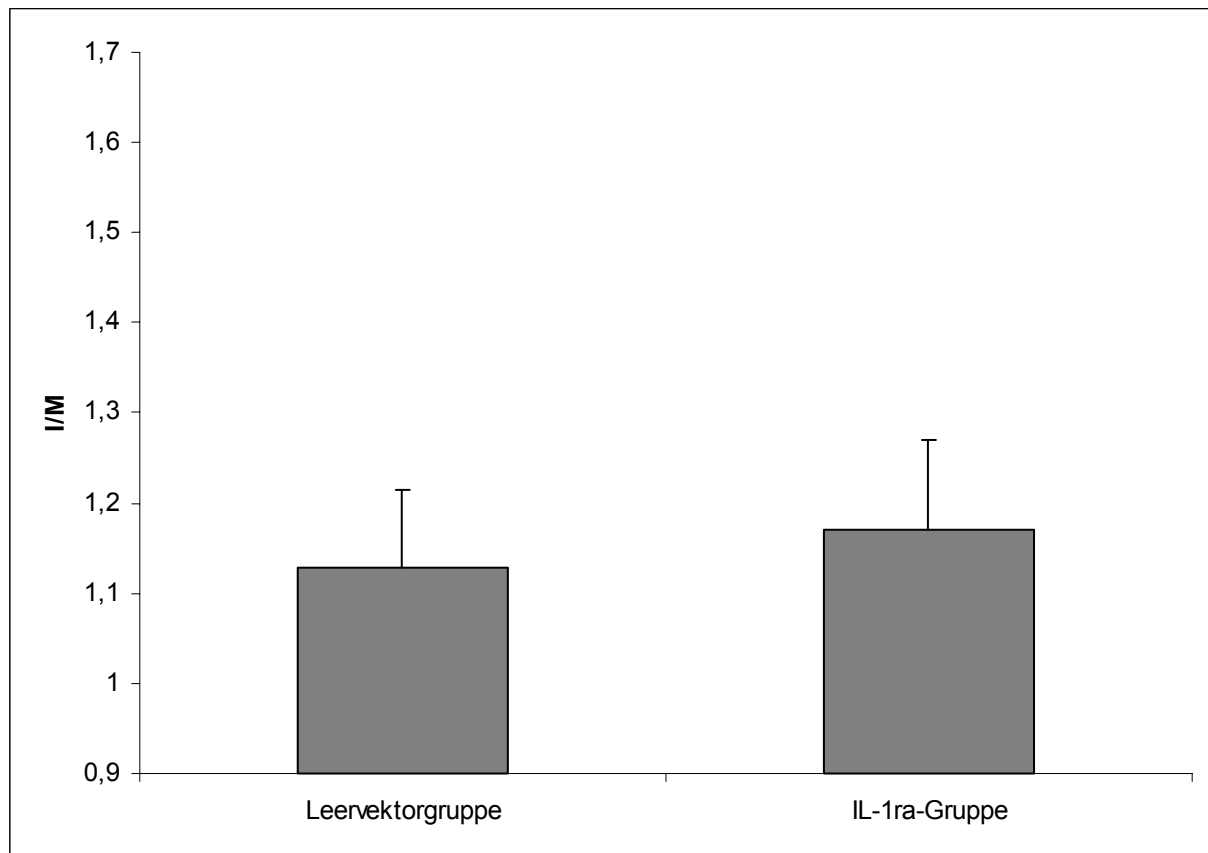
Die Ergebnisse der Ausmessung der Flächen von Neointima und Media werden in Tabelle 7 gezeigt. Dabei vergleicht man die IL-1ra- und die Leervektorgruppe insbesondere in Bezug auf das Intima/Media-Verhältnis.

Tabelle 7: Daten der histomorphometrischen Auswertung von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe

Tier	Intima(Fläche in Pixel)	Media (Fläche in Pixel)	I/M
IL-1ra	104 509,667	100 150,667	1,044
IL-1ra	75 223,333	83 655,667	0,899
IL-1ra	131 561,000	93 984,667	1,400
IL-1ra	65 178,333	58 810,667	1,108
IL-1ra	90 596,000	64 825,667	1,398
MW	93 413,667	80 285,467	1,170
SEM	11 649,897	8 043,087	0,099
Leervektor	122 571,333	94 604,000	1,296
Leervektor	88 580,333	83 668,667	1,059
Leervektor	62 269,000	74 401,333	0,837
Leervektor	100 378,667	78 061,333	1,286
Leervektor	93 973,000	80 360,000	1,169
MW	93 554,467	82 219,067	1,129
SEM	9 726,885	3 444,907	0,085
p-Wert	0,993	0,850	0,795
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.

I/M: Intima/Media-Verhältnis
 IL-1ra: Interleukin-1-Rezeptorantagonist
 MW: Mittelwert
 SEM: Standardfehler
 p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit
 n.s.: nicht signifikant

3.4.2.4 Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses der IL-1ra- und der Leervektorgruppe



I/M: Intima/Media-Verhältnis

IL-1ra: Interleukin-1-Rezeptorantagonist

Abbildung 23: Vergleich des I/M-Verhältnisses von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe

Um den Unterschied der beiden Gruppen besser darstellen zu können, beginnt die y-Achse in Abbildung 23 erst bei einem Intima/Media-Wert von 0,9. Im Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses zeigt der hohe p-Wert ($p=0,795$) keinen signifikanten Unterschied zwischen der IL-1ra- und der Leervektorgruppe. Die Überexpression von IL-1ra bewirkt keine weitere Reduktion der Neointimahyperplasie.

3.4.2.5 Beispielbilder für die zur Histomorphometrie herangezogenen Schnitte in der Elastica-van-Giesson-Färbung im Überblick

Beispielbilder für die Kontroll- und die EC-Gruppe

Um den signifikanten Unterschied der Kontroll- zu der EC-Gruppe besser verdeutlichen zu können, zeigt die Abbildung 24 jeweils ein Beispielbild von einer mit E.v.G. gefärbten restenosierten Carotis. Auf dem Bild des Kontrolltieres ist im Vergleich zu dem EC-Tier eine vermehrte Neointimabildung zu beobachten.

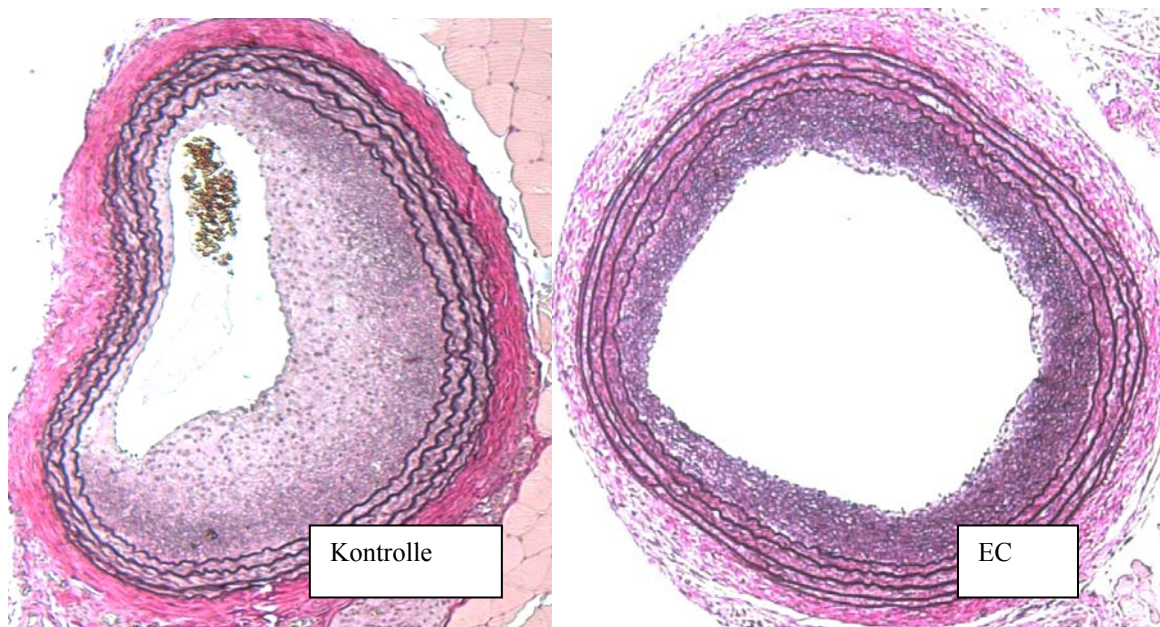


Abbildung 24: Beispielbilder für ein Kontrolltier (links) und ein EC- Tier (rechts) in der E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung

Beispielbilder für die Leervektor- und die IL-1ra-Gruppe

Die Flächenberechnung der Neointima und Media bei diesen beiden Gruppen zeigt in dem ermittelten Intima/Media-Verhältnis keinen signifikanten Unterschied. Wie die Abbildung 25 verdeutlicht, bilden die beiden Carotiden annähernd die gleiche Menge an Neointima.

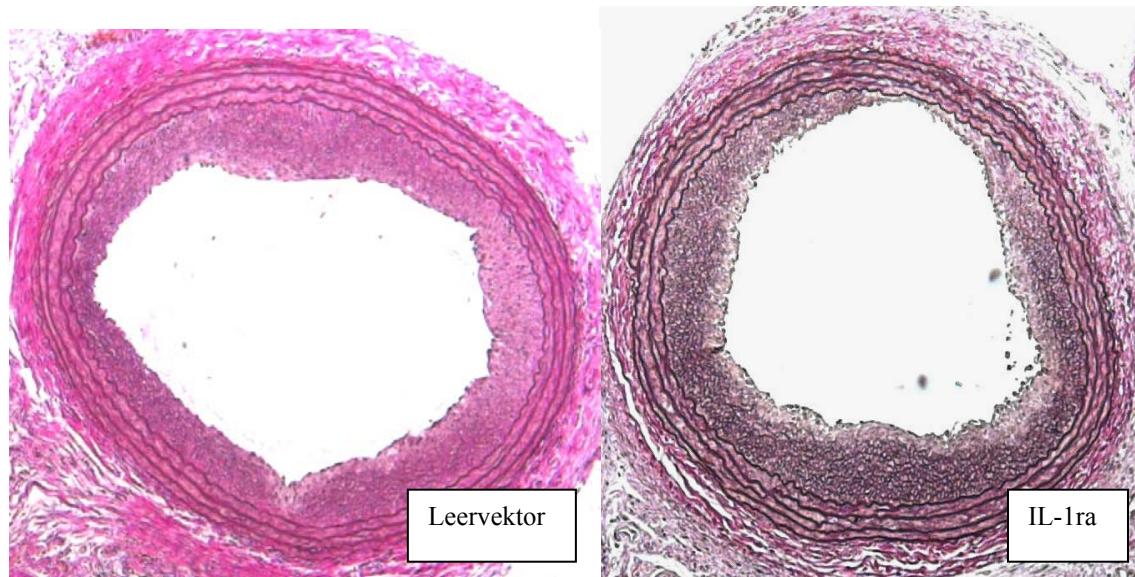


Abbildung 25: Beispielbilder für die Leervektor- (links) und die IL-1ra-Gruppe (rechts) in der E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung

3.4.2.6 Verlauf der Neointima als graphische Darstellung

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung lassen sich auch graphisch darstellen.

Die Abbildung 26 zeigt schematisch den Längsschnitt einer restenosierten Carotis.

Wie beschrieben, wird die Carotis auf verschiedenen Ebenen geschnitten und der dabei entstehende Querschnitt in Bezug auf die Fläche von Neointima und Media ausgemessen

Fügt man die Messdaten der Querschnitte nacheinander zusammen, so erhält man die Abbildung 27. Sie zeigt den tatsächlichen Verlauf der Neointima in dem mittleren Abschnitt der Carotis. Die gesamte Dicke der Media in Abbildung 26 wird in Abbildung 27 als hellgraue Fläche dargestellt. Die Größe der Neointima wird durch die dunkelgraue Fläche dargestellt.

Man kann sich die Situation so vorstellen, dass man den Ausschnitt von Abbildung 26 umgeklappt und die Werte pro Ebene in Abbildung 27 zusammengefasst hat.

Die Fläche der Media bleibt in diesem Verlauf nahezu gleich. Dagegen sieht man bei der Neointima zuerst ein langsames Ansteigen bis zum höchsten Wert, dann fällt sie wieder ab.

Der Abstand zwischen den gemessenen Schnittebenen beträgt ca. 200µm. Für die Auswertung werden die drei Daten mit den höchsten Werten zwischen den Ebenen 1 bis 7 herangezogen und deren Mittelwert berechnet.

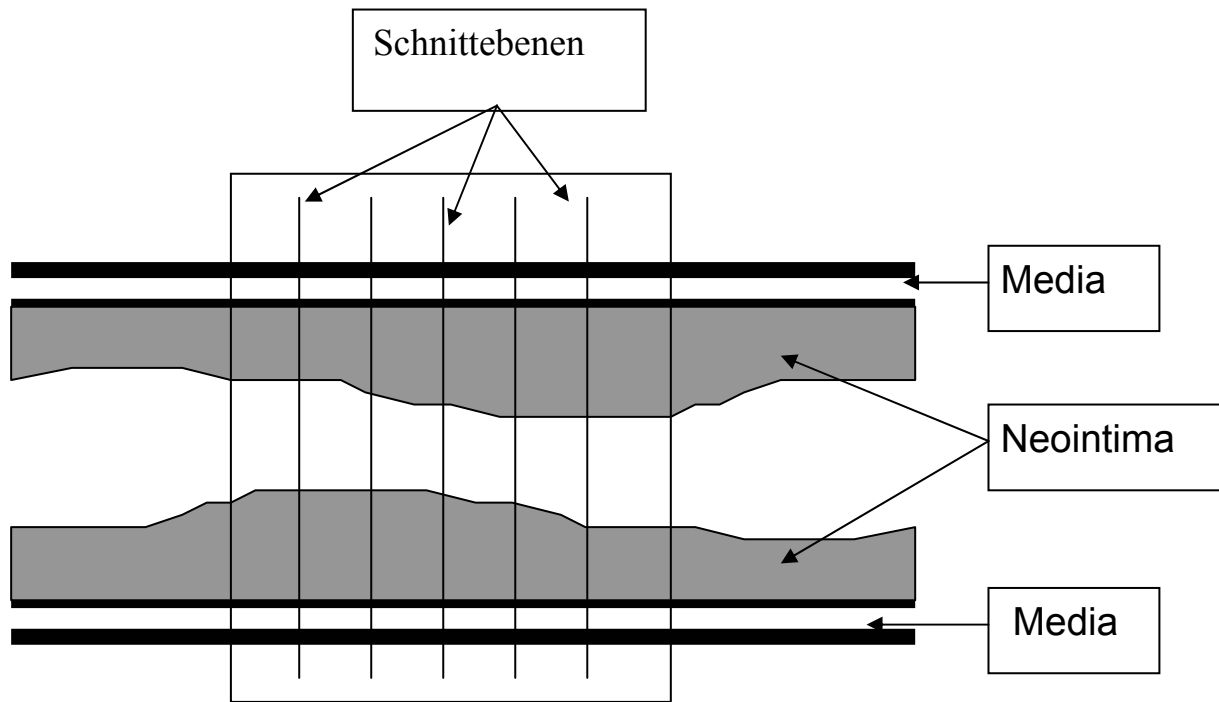


Abbildung 26: Schematischer Längsschnitt einer restenosierten Carotis

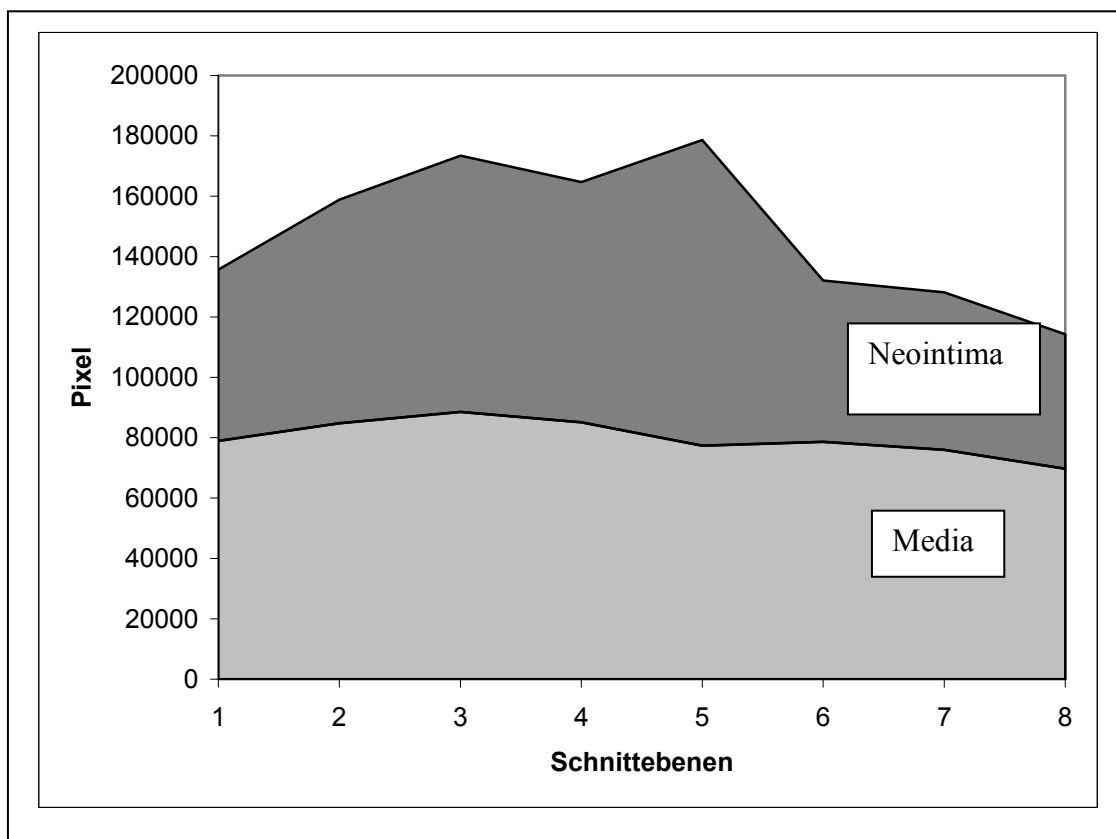


Abbildung 27: Verlauf der Neointima auf der Länge der Carotis bei einem Tier

3.4.2.7 Immunhistochemische Auswertung der proliferierenden Zellen der EC- und der Kontrollgruppe

In der folgenden Tabelle 8 sind die Mittelwerte der ausgezählten, proliferierenden Zellen pro Tier dargestellt. Dabei werden die rotgefärbten Zellen nach ihrer Lokalisation getrennt gezählt.

Tabelle 8: Ergebnisse der Proliferationsdaten von der EC- und der Kontrollgruppe

	Anzahl der proliferierenden Zellen		
Tier	Im Endothel	In der Intima	In der Media
EC	20,667	10,667	4,000
EC	11,000	14,667	1,000
EC	19,333	23,333	3,333
EC	3,000	4,333	2,000
EC	14,000	12,000	0,667
EC	4,000	5,000	0,000
MW	12,000	11,667	1,833
SEM	3,049	2,854	0,643
Kontrolle	10,333	45,000	2,333
Kontrolle	15,333	19,333	0,333
Kontrolle	3,000	73,667	6,667
Kontrolle	0,000	29,333	3,000
Kontrolle	5,000	17,333	4,333
Kontrolle	7,000	37,333	5,667
MW	6,778	37,000	3,722
SEM	2,230	8,498	0,945
p-Wert	0,158	0,030	0,636
Signifikanz	n.s.	s.	n.s.

EC: Endotheliale Zellen

MW: Mittelwert

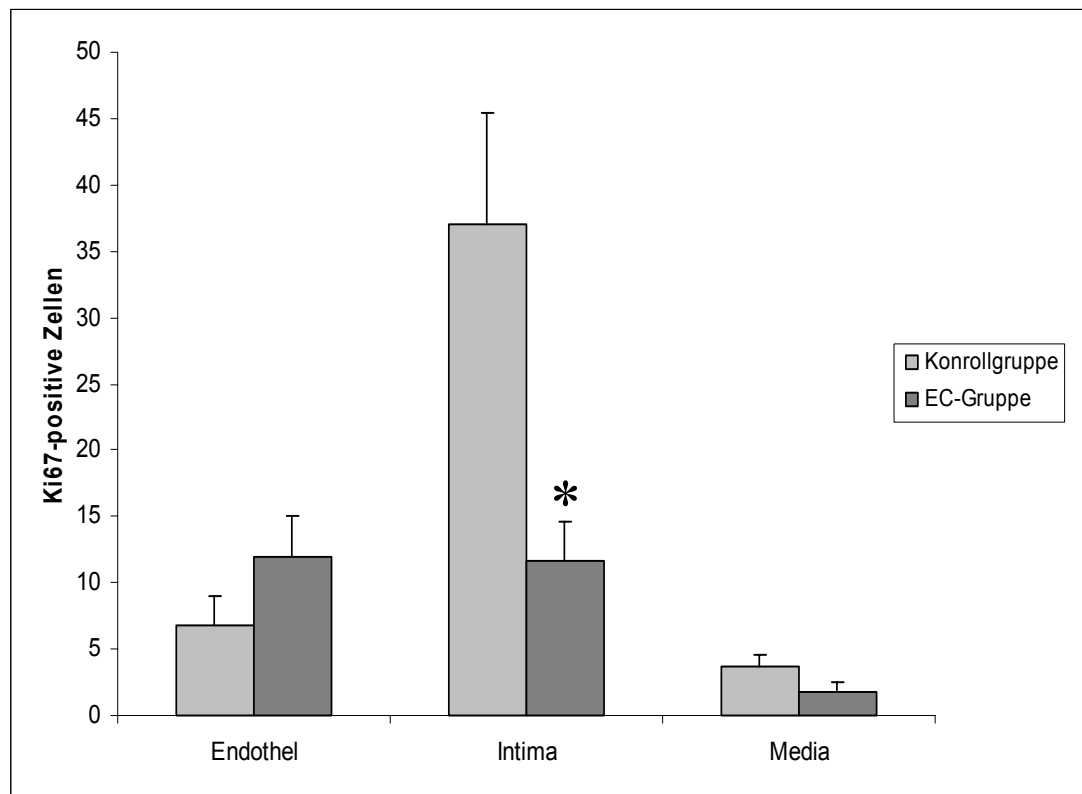
SEM: Standardfehler

n.s.: nicht signifikant

s.: signifikant

3.4.2.8 Proliferationsindex der EC- und der Kontrollgruppe

Die Auszählung der proliferierenden Zellen ergibt pro Gruppe und Lokalisation (Endothel, Intima, Media) einen Wert, der in der folgenden Abbildung 28 als Proliferationsindex dargestellt wird.



EC: Endotheliale Zellen

Abbildung 28: Proliferationsindex der EC- und der Kontrollgruppe im Vergleich

Die Abbildung 28 gibt einen Überblick zum Ergebnis der ausgezählten Ki-67-positiven Zellen, die unter 40facher Vergrößerung im Lichtmikroskop ermittelt werden.

Nach Auszählung der proliferierenden Zellen zeigt sich, dass in Bezug auf die Werte der Intima ein signifikanter Unterschied (mit * gekennzeichnet) besteht. Während im Endothel der mit EC behandelten Gruppe sogar eine etwas höhere Proliferation als bei der Kontrollgruppe besteht, sind die Werte in der Media nahezu gleich.

Die lokale Transplantation von EC reduziert signifikant die Proliferation der glatten Muskelzellen in der Intima.

3.4.2.9 Immunhistochemische Auswertung der proliferierenden Zellen der IL-1ra und der Leervektorgruppe

In den Gruppen der mit IL-1ra- bzw. Leervektorzellen transplantierten Tiere werden ebenfalls die Ki-67-positiven Zellen, getrennt nach ihrer Lokalisation, ausgezählt. Die ermittelten Daten sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Proliferationsdaten von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe

	Anzahl der proliferierender Zellen		
Tier	Im Endothel	In der Intima	In der Media
IL-1ra	6,333	6,667	2,667
IL-1ra	4,333	3,333	1,000
IL-1ra	16,667	25,333	3,000
IL-1ra	9,000	6,667	0,667
IL-1ra	3,333	40,333	8,333
MW	7,933	16,467	3,133
SEM	2,389	7,116	1,377
Leervektor	9,667	22,333	2,000
Leervektor	6,667	11,000	4,333
Leervektor	0,333	7,000	3,333
Leervektor	14,667	9,000	0,333
Leervektor	1,667	70,333	33,000
MW	6,600	23,933	8,600
SEM	2,628	11,901	6,137
p-Wert	0,736	0,535	0,219
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.

IL-1ra: Interleukin-1-Rezeptorantagonist

MW: Mittelwert

SEM: Standardfehler

p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit

n.s.: nicht signifikant

3.4.2.10 Vergleich der Proliferationsdaten der IL-1ra- und der Leervektorgruppe

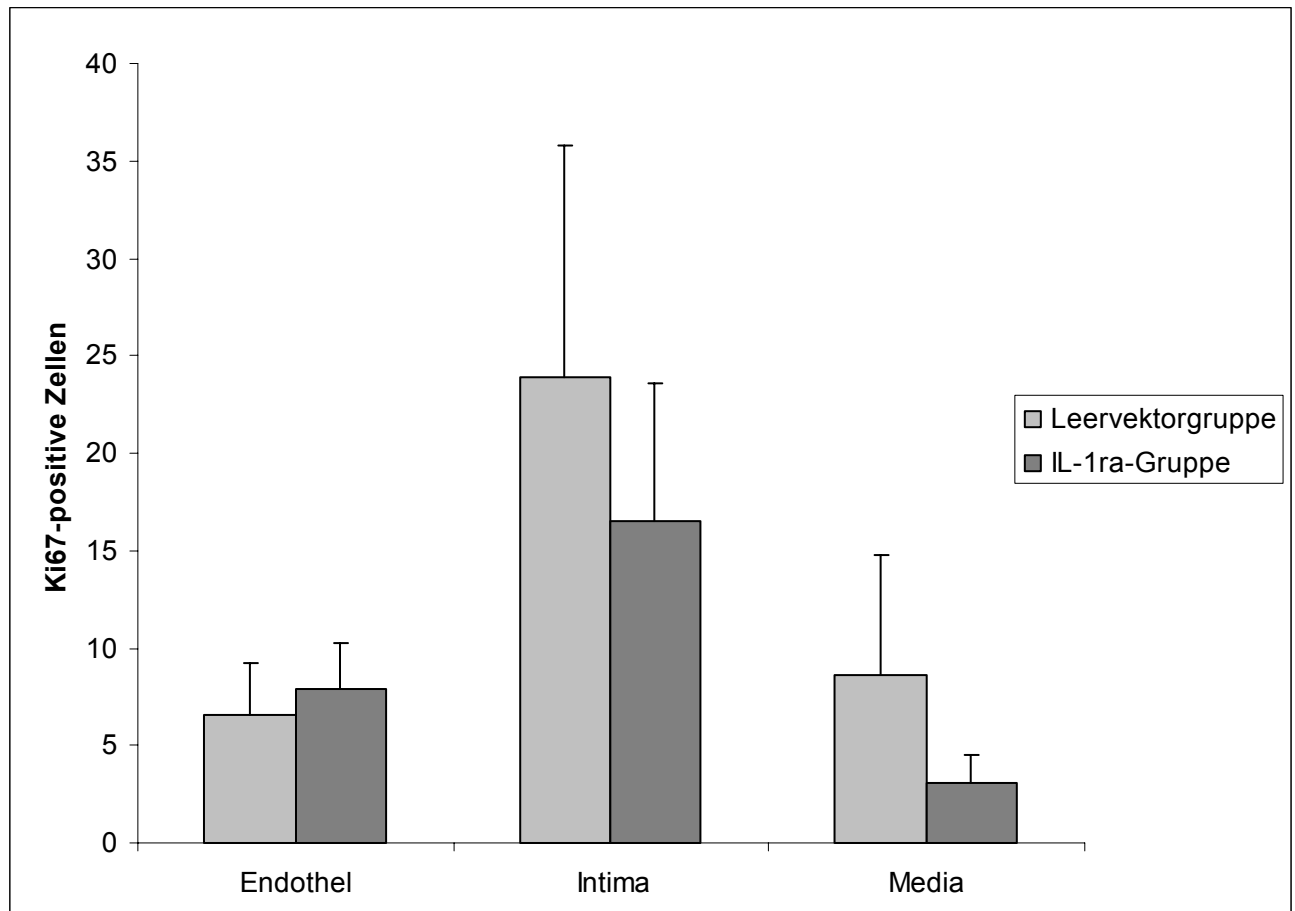


Abbildung 29: Proliferationsindex der IL-1ra- und der Leervektorgruppe im Vergleich

Die Auszählung der proliferierenden Zellen ergibt zwischen der IL-1ra-Gruppe und der Leervektorgruppe mit keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Abbildung 29 zeigt die Daten von Endothel, Intima und Media im Vergleich. Die Werte der Leervektorgruppe liegen mit einer hohen Standardabweichung in Bezug auf die Auszählung von Intima und Media höher als die der IL-1ra-Gruppe.

Die Überexpression von IL-1ra kann die Proliferationsrate der glatten Muskelzellen nicht signifikant weiter reduzieren.

3.4.2.11 Beispielbilder für Ki-67-gefärbte Schnitte

Auf der Abbildung 30 sind auf dem Ausschnitt aus der Neointima mehrere rot gefärbte, proliferierende Zellen zu finden. Diese Probe von einem Kontrolltier zeigt im Vergleich zu einem mit EC transplantierten Gefäßabschnitt (Abbildung 31) einen deutlichen Unterschied. Die Carotis des EC-Tieres weist in Abbildung 31 nur einzelne proliferierende Zellen in der Neointima auf. In der Media kann eine einzelne rot gefärbte Zelle beobachtet werden.

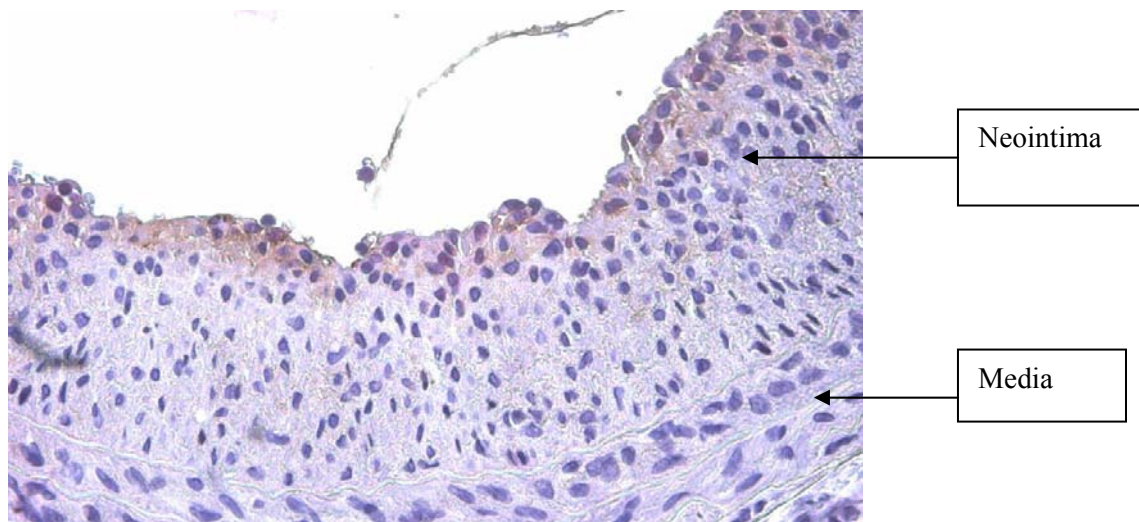


Abbildung 30: Ausschnitt von einem Kontrolltier nach Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67, 40fache Vergrößerung

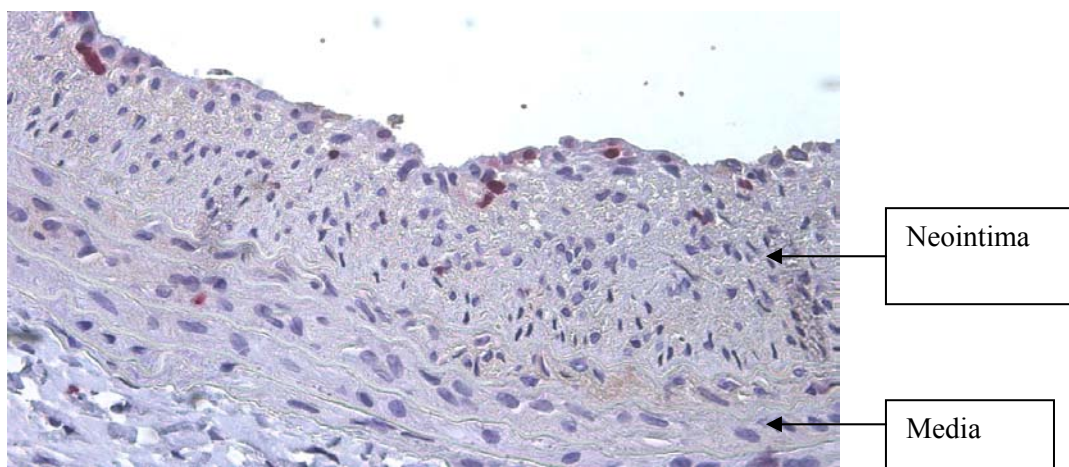


Abbildung 31: Proliferierende Zellen in einem mit EC behandelten Tier, 40fache Vergrößerung

Bei der Betrachtung von IL-1ra- und Leervektorgruppe kann ebenfalls eine insgesamt geringe Proliferationsrate beobachtet werden. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied. Die Abbildungen 32 und 33 zeigen jeweils einen Ausschnitt mit Ki-67-gefärbten Zellen in der Neointima an. Auf Abbildung 33 sind auch vereinzelte proliferierende Zellen in der Media dargestellt.

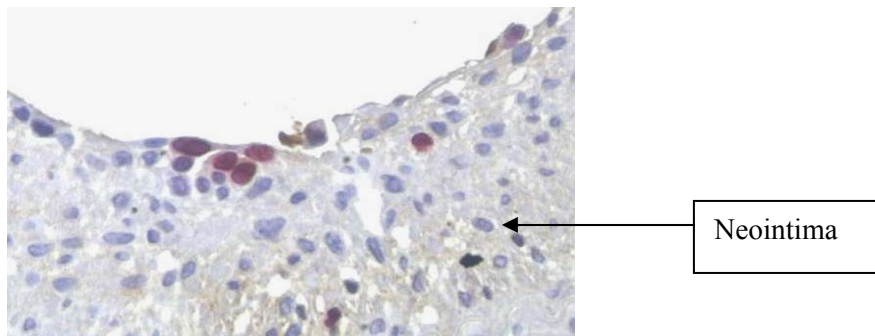


Abbildung 32: Ausschnitt aus einem mit Ki-67 gefärbten Schnittes von einem IL-1ra-Tier, 40fache Vergrößerung

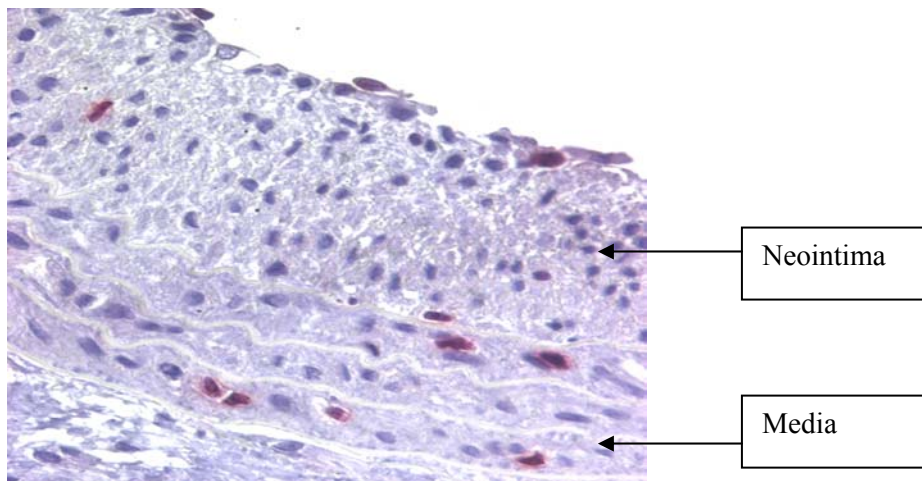


Abbildung 33: Proliferierende Zellen von einem Leervektortier, 40fache Vergrößerung

3.4.2.12 Anzahl der CD31-positiv gefärbten Zellen im Vergleich

Wenn man die Anzahl der humanen, CD31-positiv gefärbten Zellen von dem 1. bzw. 3. Tag mit dem 14. Tag vergleicht, kann man eine Reduktion beobachten. Während am 1. bzw. 3. Tag noch ca. 17 Zellen nachgewiesen werden können, sind am 14. Tag nur noch ca. 3 CD31-positive Zellen nachweisbar. Die Anzahl der direkt nach der Verletzung adhärenierten Zellen scheint auszureichen, um einen reduzierenden Einfluss auf die Neointimabildung ausüben zu können. Nach 14 Tagen sind deutlich weniger Zellen mit humaner, CD31-positiver Oberflächenstruktur vorhanden.

Eine Quantifizierung der Zellen, die eine Kolokalisation aufweisen, ist nicht möglich, da nach 14 Tagen nur noch eine geringe Anzahl von Zellen vorhanden ist.

4 DISKUSSION

4.1 Carotis-Verletzungsmodell an der Thymus-losen Nacktratte

Je nach Fragestellung gibt es verschiedene Kriterien, die die Auswahl des Tiermodells beeinflussen. Das ideale Tiermodell, das alle Bedingungen erfüllt, existiert bis heute noch nicht. Deshalb muss man je nach Fragestellung Prioritäten setzen.

Nachahmung der menschlichen Verhältnisse ist für den vorliegenden Versuch bei Thymus-losen Tieren zum größten Teil erfüllt. Man kann das Verhalten von humanen endothelialen Zellen nur eindeutig prüfen, wenn es nicht gleichzeitig von immunologischen Vorgängen beeinflusst wird.

Das Carotis-Verletzungsmodell bietet den Vorteil, dass die lokal transplantierten, humanen endothelialen Zellen in einem begrenzten Gebiet zielgerichteter untersucht werden können. Auf diese Weise kann man das Anhaftungsverhalten und die Auswirkung der endothelialen Zellen und deren Gentransfizierung auf das Proliferationsgeschehen und somit auf die Neointimahyperplasie genauer beobachten.

Das Ballonmodell ist das best erforschte und benutzte Modell zur Untersuchung der Neointimahyperplasie. Ratten entwickeln eine schnelle und vorhersehbare proliferative Antwort auf eine Ballondilatation. Die Neointimadicke erreicht etwa 3 Wochen nach der Verletzung ihren Peak und bleibt danach relativ konstant (MULLER et al. 1992).

Dieses Modell ist sehr gut geeignet, um Proliferationsverhalten von glatten Muskelzellen der Media zu beobachten (CLOWES et al. 1983 a und b).

Ebenso beschreiben zahlreiche Studien das Reendothelialisierungsverhalten unter diesem Modell sehr genau (FISHMAN et al. 1975, STEMERMAN et al. 1977, HAUDENSCHILD und SCHWARTZ 1979).

Aber Tiermodelle können auch Nachteile aufweisen. Besonders wenn es um die Nachahmung von menschlichen Verhältnissen geht, treten anatomische Kritikpunkte auf: Die Gefäßgröße stellt dabei einen wichtigen Punkt dar. Das Rattengefäß ist viel kleiner und weist strukturelle Unterschiede auf. Es besitzt eine sehr dünne Intimaschicht, die direkt auf der inneren elastischen Membran aufliegt (MULLER et al. 1992).

Koronararterien enthalten als muskuläre Arterien viel weniger Elastin als Carotiden (KANTOR et al. 1999).

Als ein weiterer Kritikpunkt bei der Ratte ist zu erwähnen, dass sie keine spontane Atherosklerose entwickeln (BADIMON 2001, CULLEN et al. 2003).

Tierstudien sind nur bedingt auf die Menschen übertragbar. Intrinsische Unterschiede zwischen den Spezies in Bezug auf Medikamenten- und Fettstoffwechsel, ebenso wie im Gerinnungssystem spielen eine entscheidende Rolle (MULLER et al. 1992).

Daneben gibt es auch einen technisch bedingten Kritikpunkt. So kritisieren INDOLFI et al. (2002), dass im Tiermodell der Ratte der 2F-Fogarty-Ballon eingesetzt wird und nicht der PTCA-Katheter, den man beim Mensch in der Klinik routinemäßig verwendet. Dazu muss man aber erwähnen, dass in der Forschung das Ballonverletzungsmodell an sich schon lange vor der klinischen Anwendung eingesetzt wurde, und dass die Vorgänge bei diesem Modell bereits bestens erforscht sind (LAFONT und FAXON 1998).

4.2 Vorversuch

In Tiermodellen werden verschiedene Verfahren eingesetzt, um eine arterielle Endothelverletzung, wie sie beim Menschen nach koronaren Interventionen entsteht, nachahmen zu können. Ob dabei eine endotheliale Denudation („Entblößung“) allein ausreichend ist, um eine Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC), und damit eine Neointimahyperplasie induzieren zu können, gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben.

So stellen FISHMAN et al. (1975) fest, dass die Denudation des Endothels eine Neointimbildung bewirkt. Ebenso postuliert SCHWARTZ (1994), dass bei der Ratte die Denudation allein ausreichend für Neointimbildung sei.

Dagegen räumen CLOWES et al. (1983 b) ein, dass bei allen Modellen wahrscheinlich nicht nur durch die alleinige Endothelverletzung, sondern auch durch Schädigung der Media eine Neointimahyperplasie entsteht. Die arterielle Wanddehnung, Verletzung der glatten Muskelzellen und Überdehnung wie bei Hypertension können wichtig im Verletzungsprozess sein.

In dem dargestellten Vorversuch vergleicht man die Draht- und die Ballonverletzung auf zwei Sachverhalte hin miteinander: In Bezug auf Neointimbildung und auf Adhäsionsvermögen der Zellen.

CLOWES et al. (1989) beschreiben, dass die Drahtverletzung zwar eine Denudation bewirkt, dass sie aber im Gegensatz zur Ballonverletzung keine Neointimbildung induzieren kann.

Die oben genannten Denudationsversuche sind immer nur an Ratten mit normalem Immunsystem (z.B. Wistar-Ratten bei HAUDENSCHILD und SCHWARTZ 1979 oder Sprague-

Dawley-Ratten von CLOWES et al. (1983 a und b), und nicht an Thymus-losen Nacktratten durchgeführt worden.

FERNS et al. (1991) beschreiben jedoch in ihrer Untersuchung auch eine Neointimabildung nach einer Ballonverletzung bei Thymus-losen Nacktratten.

Im vorliegenden Vorversuch beobachtet man im Vergleich der beiden Verletzungsmodelle nach der Drahtverletzung bei den Thymus-losen Nacktratten keine, nach der Ballonverletzung dagegen eine deutliche Neointimabildung, obwohl das Ergebnis der Evans Blue-Färbung zeigt, dass die Drahtverletzung eine stärkere Endothelverletzung hervorruft. Daraus kann geschlossen werden, dass die Überdehnung der Media und der elastischen Membranen notwendig ist, um eine Neointimaproliferation auszulösen.

Auch in Bezug auf das Anhaftungsverhalten von endothelialen Zellen an verletztes Endothel gibt es widersprüchliche Aussagen. Die meisten Studien belegen, dass nach einer Ballonverletzung die transplantierten endothelialen Vorläuferzellen im Endothel nachgewiesen werden können. GRIESE et al. (2003 b), GULATI et al. (2004) und KONG et al. (2004) benutzen dabei folgendes Verfahren: Aus dem peripheren Blut von Kaninchen isolieren sie mononukleäre Zellen, lassen diese in Kultur in Endothelzellmedium im einem Zeitraum von zwei bis vier Wochen zu endothelialen Vorläuferzellen differenzieren. Nach vorausgegangener Ballonangioplastie werden die differenzierten Zellen dann direkt lokal transplantiert, d.h. autolog wieder in die gleiche Tierspezies zurücktransplantiert. Die Adhäsion dieser Zellen können sie in der histologischen Aufarbeitung der Gefäße im Endothel nachweisen. Durch diese Reendothelialisierung können sie die Neointimabildung signifikant reduzieren.

Dagegen gelangen FUJIYAMA et al. (2003) zu einem anderen Ergebnis: Sie transplantieren lokal humane, mononukleare Zelllinien in die Carotis von Nacktratten.

Am Ballonverletzungsmodell vergleichen sie dabei das Adhäsionsverhalten von verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von dem Monozyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1). Ihre Schlussfolgerung lautet: „Reendothelialisierung durch Transplantation von CD34-positiven Zellen kann nur bei MCP-1 stimulierten Zellen, aber nicht bei MCP-1 unbehandelten Zellen beobachtet werden.“ Humane Zellen können demzufolge nach nur in stimuliertem Zustand an die ballonverletzte Gefäßwand adhären.

In den eigenen Vorversuchen kann man in der Fluoreszenzuntersuchung zeigen, dass die transplantierten, unstimulierten Zellen nur nach der Draht-, aber nicht nach der Ballonverletzung in der Lage sind, zu adhären.

Beim Vergleich mit der Evans Blue-Färbung kann man nur bei der Drahtverletzung eine deutliche Endothelbeschädigung beobachten.

FUJIYAMA et al. (2003) finden in diesem Zusammenhang noch etwas anderes heraus. Sie führen eine Untersuchungsreihe mit Evans Blue-Färbung durch und kommen zu dem Ergebnis: „Das Endothel verliert bereits sofort nach einer Ballonverletzung seine endotheliale Funktion, obwohl es einen Tag nach der Verletzung immer noch auf der inneren Membran präsent zu sein scheint.“

Das könnte eine mögliche Erklärung für das Ergebnis im eigenen Vorversuch sein. Nach der Evans Blue-Färbung scheint das frisch verletzte Endothel nach Ballonangioplastie noch intakt. Es zeigt sich kein makroskopischer Unterschied zu einem unverletzten Gefäß.

Wenn die Zellen nun direkt nach der Verletzung appliziert werden, scheinen die noch vorhandenen, aber funktionslosen Endothelzellen eine Art Schutzmauer darzustellen. Bei der Drahtverletzung dagegen werden die Endothelzellen von der Wand geschabt und die extrazelluläre Matrix freigelegt. Das spricht dafür, dass endotheliale Vorläuferzellen eine relativ starke Verletzung benötigen, um auf der Matrix unter den Endothelzellen adhären zu können.

TANAKA et al. (2003) gelangen in ihrer Studie in Bezug auf Drahtverletzung zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Untersuchung bezieht sich dabei allerdings auf einen Transplantationsversuch bei Mäusen. Aus Knochenmark stammende Vorläuferzellen für glatte Muskelzellen können im Vergleich verschiedener Verletzungsmodelle bei der Drahtverletzung am besten adhären. Die Neointima besteht nach der Drahtverletzung in diesem Fall aus sehr vielen Zellen, die aus transfundierten Knochenmarkzellen stammen.

Fasst man nun die Ergebnisse aus der Literatur und dem vorliegenden Versuch zusammen, könnte das bedeuten, dass humane endotheliale Zellen im xenogenen Tierversuch im Unterschied zum autologen animalen Modell (GRIESE et al. 2003 b, GULATI et al. 2004 und KONG et al. 2004) auf andere Weise adhären. Bei der autologen Transplantation scheinen die durch die Ballonverletzung im Tier induzierten endogenen Stimuli auszureichen, um die ins Tier zurücktransplantierten, (exogen unstimulierten) Zellen speziesspezifisch adhären zu lassen.

Bei dem eigenen xenogenen Tierversuch dagegen scheinen die humanen, expandierten endothelialen Zellen nach einer Ballonverletzung im Tiermodell nicht genug endogen stimuliert zu werden, um adhären zu können. Erst die Drahtverletzung bzw. stärkere Stimulation scheinen die notwendige Voraussetzung einer Adhäsion zu bieten, wie auch FUJIYAMA et al. (2003) zeigen.

Bei vorliegendem Ergebnis in Bezug auf den Nachweis der Fluoreszenz nach 14 Tagen muss man in Erwägung ziehen, dass die Zellen nach dieser Zeit eventuell bereits untergegangen sind, aber der Farbstoff über Endozytose auf andere Zellen übergegangen ist. Dies kann anhand der immunhistochemischen Untersuchung ausgeschlossen werden. Im Paraffinschnitt sind deutlich positiv gefärbte Zellen nachweisbar (siehe unten Hauptversuch).

4.3 Hauptversuch

4.3.1 Endotheliale Zellen

Welche wichtige Funktion ein intaktes Endothel darstellt wird klar, wenn ein Defekt und seine Folgen vorliegen. Zahlreiche Studien haben aufgezeigt, dass nach einer Verletzung die Reendothelialisierung indirekt einen bedeutenden Einfluss auf die Neointimahyperplasie ausübt, in dem sie die Proliferation von glatten Muskelzellen inhibiert.

So beschreiben FISHMAN et al. (1975), dass die immer noch nicht reendothelialisierten Stellen Ödeme und Anzeichen einer Proliferation aufweisen. Ebenso zeigen HAUDENSCHILD und SCHWARTZ (1978), dass sich 7 Tage nach einer Verletzung nur in den Regionen glatte Muskelzellen zeigen, wo noch kein regeneriertes Endothel zu beobachten ist.

Nach Ballondenudation bei einem Rattenversuch ist das mittlere Drittel nach 12 Wochen immer noch nicht mit regeneriertem Endothel bedeckt. In chronisch deendothelialisierten Regionen bleibt die Proliferation bis 3 Monate nach Verletzung erhalten (CLOWES et al. 1983 b).

Die Tierversuche zeigen, dass die Reendothelialisierung eine bestimmte Zeit benötigt, bis sie abgeschlossen ist. Man kann diesen Sachverhalt auch beim Menschen feststellen. Histologische Untersuchungen von humanen, myokardialen Gefäßen weisen einen Monat nach Verletzung noch nicht reendothelialisierte Stellen auf (BAUTERS et al. 1996).

Um mehr über den Mechanismus und die Dauer der Reendothelialisierung zu erfahren, sind eine Vielzahl von Tierversuchen durchgeführt worden. Dort wird beschrieben, wie Knochenmarkszellen bzw. weiterdifferenzierte endotheliale Vorläuferzellen autolog transplantiert werden, um durch schnellere Reendothelialisierung die Proliferation von glatten Muskelzellen zu hemmen und dadurch eine Neointimabildung zu vermindern. Für diesen Zweck gewinnt man, wie oben beschrieben, endotheliale Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut von Kaninchen.

Wenn die Zellen in Kultur vorliegen, können sie darüber hinaus sehr einfach mit einem retroviralen Vektor transduziert werden. Untersuchungen dieser Art von KONG et al. (2004) ergaben eine Überexpression von endothelialer NO-Synthase. Nach Ballonverletzung der Carotis werden die Zellen unmittelbar in das Gefäß appliziert.

Dabei können GRIESE et al. (2003 a und b), GULATI et al. (2004) und KONG et al. (2004) die Zellen nach einem gewissen Zeitraum (2 bis 4 Wochen) im Gefäß nachweisen. Alle drei Arbeitsgruppen beschreiben eine frühe Reendothelialisierung nach drei Tagen.

Als Folge dieser frühen Reendothelialisierung können sie eine signifikante Reduktion der Neointimahyperplasie zeigen.

Allerdings postulieren GRIESE et al. (2003 a) noch im gleichen Jahr, dass die lokale Transplantation von autologen, endothelialen Vorläuferzellen bei der Ratte zwar zu einer beschleunigten Reendothelialisierung führt, dass aber gleichzeitig eine gesteigerte Neointimabildung beobachtet wird. Die differenzierten, endothelialen Zellen stammen dabei ursprünglich aus einer Mischpopulation, die sowohl aus peripherem Blut als auch aus Knochenmarkszellen gewonnen wird. Sie beschreiben zwar, dass sie aufgrund von immunhistochemischen Verfahren eine Kontamination mit monozytären Zellen weitgehend ausschließen können, aber anhand eines exprimierten Oberflächenantigens können sie feststellen, dass die Zellen in aktiviertem Zustand appliziert worden sind. Diese Aktivierung bewirkt Leukozytenadhäsion. Die gesteigerte Neointimabildung lässt sich somit durch ein vermehrtes Einwandern von Entzündungszellen erklären. Außerdem werden die Tiere bereits am 7. Tag getötet und die Carotiden ausgewertet. Die Ausmessung der Neointimahyperplasie findet bei den meisten Studien aber erst nach 14 bzw. 28 Tagen statt. Diese Daten sind somit nicht gut mit anderen vergleichbar.

Über die Beteiligung von menschlichen endothelialen Zellen am Reendothelialisierungsprozess im Tiermodell gibt es erst wenige Untersuchungen.

FUJIYAMA et al. (2003) können in ihrer Studie eine Reduktion der Neointimabildung beobachten. Allerdings nur, wenn die humanen, aus peripheren monozytären Zellen differenzierten, endothelähnlichen Zellen mit MCP-1 stimuliert werden. Nur durch diese Stimulation sind sie in der Lage, nach Ballonangioplastie bei der Nacktratte adhären zu können.

In der vorliegenden Untersuchung sind erstmalig humane, expandierte endotheliale Zellen in einem kombinierten Draht- und Ballonverletzungsmodell in der Nacktratte lokal transplantiert worden. Im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass durch die Drahtverletzung die humanen endothelialen Zellen adhären können, und dass durch Ballonverletzung auch eine reprodu-

zierbare Neointimabildung induziert wird. Die Kombination aus beiden Verletzungsmodellen wird an der Carotis im Hauptversuch bei allen vier Gruppen eingesetzt. Bei drei Gruppen transplantiert man lokal jeweils verschiedene Zellen. Die Kontrollgruppe erhält keine Zellen. 14 Tage nach dem Eingriff erfolgt die Auswertung der Proben.

In der histomorphometrischen Untersuchung werden die Flächen der Neointima und der Media ausgemessen. Das aus diesen Werten berechnete Intima/Media-Verhältnis zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den mit humanen endothelialen Zellen transplantierten und den unbehandelten Tieren.

Dass die Neointimabildung maßgeblich durch die Proliferation von glatten Muskelzellen bestimmt wird, ist in zahlreichen Studien hinreichend untersucht worden.

Die Ergebnisse der ausgezählten proliferierenden Zellen bestätigen diesen Zusammenhang. Die Kontrollgruppe zeigt eine signifikant höhere Proliferationsrate in der Intima. Die lokale Transplantation von humanen, expandierten endothelialen Zellen reduziert durch Reendothelialisierung die Proliferation glatter Muskelzellen und vermindert damit gleichzeitig eine Neointimahyperplasie.

Über wie lange und wie viele Zellen nach ihrer Applikation noch in der Gefäßwand nachweisbar sind, gibt es verschiedene Angaben. KONG et al. (2004) können die lokal transplantierten Zellen, die mit grünem Fluoreszenzprotein (GFP) transduziert sind, noch nach 2 Wochen im Gefäß lokalisieren. GULATI et al. (2004) können sogar noch 4 Wochen nach der Ballonangioplastie ihre lokal transplantierten, Fluoreszenz-markierten Zellen vor allem in der Media, aber auch in der Neointima und der Adventitia finden.

GRIESE et al. (2003 b) beschreiben eine signifikante Verminderung der transplantierten Zellen nach 2 Wochen. 4 Wochen post Intervention können sie keine Zellen mehr nachweisen.

Der immunhistochemische Nachweis der humanen Zellen in der eigenen Arbeit zeigt, dass zwischen dem 1. und 3. Tag nach Drahtverletzung und lokaler Transplantation, noch ca. 17 CD31-positiv gefärbte humane Zellen pro Schnitt auffindbar sind, und 14 Tage später noch ca. 3 Zellen. Daneben gibt es allerdings auch Zellen, die nur schwach gefärbt sind. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass nach 14 Tagen einige der Zellen eine Veränderung in ihrer Antigenoberflächenexpression aufweisen, oder abgebaut werden.

Dieser Abbau könnte durch natürliche Regenerationsprozesse oder immunologische Prozesse bedingt sein, da bei der scheinbar immuninkompetenten Nacktratte immer noch B-Zellen und natürliche Killerzellen vorkommen.

Vereinzelt zeigen die nachgewiesenen humanen, endothelialen Zellen eine Kollokalisierung mit dem Proliferationsmarker. Eine Quantifizierung dieser Zellen ist allerdings aufgrund der geringen Anzahl der nach 14 Tagen noch vorhandenen Zellen nicht möglich.

Fasst man nun die signifikanten Ergebnisse des eigenen Versuches zusammen, so steht dies im Einklang mit der Hypothese, dass eine frühe Reendothelialisierung ausreicht, um die Proliferation glatter Muskelzellen und der damit assoziierten Neointimabildung zu hemmen.

4.3.2 IL-1ra

Die Entzündung ist nach KEREIAKES (2003) der zentrale Punkt der Pathogenese von atherothrombotischen Gefäßerkrankungen und auch von akuten Koronarsyndromen. Sie ist außerdem die Antwort auf eine Gefäßverletzung nach perkutaner koronarer Intervention.

In einer Studie konnte man zeigen, dass im Rahmen einer systemischen Entzündung der Anstieg des Entzündungszytokins Interleukin-1 β mit einer gesteigerten Neointimabildung verbunden ist (DANENBERG et al. 2002).

Die Interleukin-1-Aktivität stellt nach DEWBERRY et al. (2000) ein komplexes Geschehen dar, das zum Teil von dem natürlich vorkommenden Inhibitor, dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), reguliert wird. Der IL-1ra scheint dabei auch eine Rolle bei der Neointimabildung zu spielen. So zeigen IL-1ra-knock-out-Mäuse nach Verletzung deutlich mehr Neointimahyperplasie als normale Mäuse (ISODA et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mehr über die Funktion von IL-1ra zu erfahren, in dem die humanen, expandierten endothelialen Zellen stabil mit IL-1ra transfiziert worden sind. Zu diesem Zweck wurden sowohl die mit IL-1ra-überexprimierten Zellen als auch die mit Leervektor transfizierten Zellen lokal transplantiert und histologisch miteinander verglichen.

Die Proliferation von glatten Muskelzellen spielt, wie bekannt, eine bedeutende Rolle bei der Neointimabildung. Im Vergleich der IL-1ra- mit der Leervektorgruppe ergibt sich nach Auszählung der proliferierenden Zellen kein Unterschied. Ebenso können die IL-1ra- und die Leervektor-transfizierten Zellen nach der histomorphometrischen Ausmessung keinen Unterschied in Bezug auf die Neointimabildung aufweisen, was sich in dem Ergebnis des Intima/Media-Verhältnisses widerspiegelt.

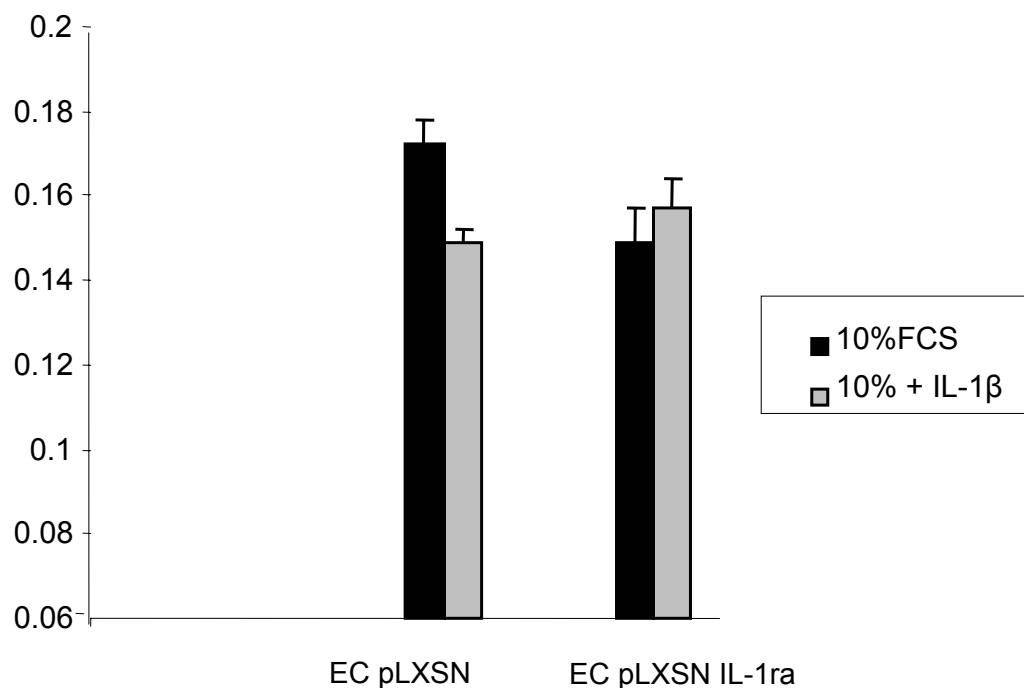
DISKUSSION

Neben der Zellteilung (Proliferation) ist auch das Einwandern von Zellen aus der Umgebung (Migration) an der Neointimabildung beteiligt. Verschiedene Studien können dabei nachweisen, dass IL-1 β die Migration von Endothelzellen hemmt (FRECH in Vorb.).

Im Migrationsversuch im Rahmen des Gesamtprojektes der eigenen Arbeitsgruppe zeigen die IL-1ra-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen ein unterschiedliches Verhalten (FISCHER in Vorb.).

In der Abbildung 34 stellen die schwarzen Säulen jeweils das Migrationsverhalten von Leervektor (pLXSN)- und IL-1ra-Zellen nach Stimulation mit 10%igem fetalem Kälberserum dar. Die zusätzliche Zugabe des Entzündungszytokins IL-1 β (graue Säule) führt bei dem Leervektor zu einer verminderten Migration, bei den IL-1ra-transfizierten Zellen dagegen bleibt die Migration nahezu gleich.

migrated cells [mOD]



EC pLXSN:	Endotheliale Zellen mit Leervektor pLXSN transfiziert
EC pLXSN IL-1ra:	Endotheliale Zellen mit Interleukin-1-Rezeptorantagonist transfiziert
IL-1 β :	Interleukin-1 β
FCS:	fetales Kälberserum
mOD:	Einheit in Milli-Optische Dichte

Abbildung 34: Migrationsversuch nach Stimulation von Interleukin-1 β

Durch die Stimulation mit IL-1 β können die IL-1ra-transfizierten Zellen mehr migrieren als die durch IL-1 β in ihrer Migration gehemmten Leervektorzellen. Die IL-1ra-Überexpression hebt damit die von IL-1 β induzierte Migrationshemmung auf und scheint sogar einen stimulierenden Effekt auf die Endothelzellmigration auszuüben.

Wenn man davon ausgeht, dass die IL-1ra-Überexpression zum einen die Entzündungsreaktion (insbesondere die Rekrutierung von Monozyten) hemmt und dadurch die Neointimabildung reduzieren könnte, aber zum anderen gleichzeitig die Migration glatter Muskelzellen steigert, kann man sich das Ergebnis der eigenen Untersuchung erklären. Denn der positive Wirkeffekt der Entzündungshemmung wird gegen den negativen Effekt der Migrationssteigerung aufgehoben.

Eine weitere Erklärung, warum die IL-1ra-Überexpression keine weitere Reduzierung der Intimahyperplasie bewirkt, könnte nach NEWBY und ZALTSMAN (2000) daran liegen, dass Ratten wenig inflammatorische Antwort zeigen. Doch FERNS et al. (1991) können bei der Nacktratte nach Ballonangioplastie nachweisen, dass die Zellen der Neointima zu 1% aus Leukozyten (0,7% Makrophagen), allerdings nur aus 0,1% T-Zellen bestehen.

4.4 Verifizierung des Therapieerfolges

In den Vorversuchen kann keine Ausfallsrate beobachtet werden. Alle 17 Proben sind auswertbar. Dagegen zeigt sich im Hauptversuch, dass durch die Kombination von beiden Verletzungsmodellen die Gefäße teilweise viel zu stark verletzt werden. Ca. 5 % der Tiere versterben intraoperativ aufgrund von zu starkem Blutverlust.

Für die histologische Auswertung werden keine Gefäße herangezogen, die ein deutliches Ausschlusskriterium erfüllen. Bei 9 Proben ist überhaupt keine Neointimabildung zu beobachten. Der eingesetzte Ballonkatheter hat in diesem Fall trotz inflatierter Luft nicht die erforderliche Überdehnung der Media induzieren können. Vermutlich verursacht durch ein unbemerktes Entweichen der Luft.

Bei 26 Proben ist das Lumen komplett verschlossen und nicht auswertbar. Dieser Verschluss ist bei einem Teil der Proben auf eine vollständige Thrombosierung zurückzuführen. Bei dem anderen Teil liegt eine so starke Verletzung vor, dass sogar die äußere elastische Membran zerstört ist und die Struktur des Gefäßes kaum mehr erkennbar ist.

Ob eine Probe ein Ausschlusskriterium aufweist, hat sich immer erst nach dem Schneiden und der Färbung mit Elastica-van-Giesson herausgestellt.

Die operative Anwendung von beiden Verletzungsarten scheint einen recht belastenden Eingriff für das Gefäß darzustellen.

Denn um einen standardisierten Vergleich im eigenen Versuch gewährleisten zu können, wird während des operativen Eingriffes stets die gleiche Ballongröße und der gleiche Ballondruck eingesetzt.

Zur Quantifizierung der Neointimahyperplasie wird die Histomorphometrie, die eine standardisierte Methode darstellt, herangezogen (FUJIYAMA et al. 2003, GRIESE et al. 2003 a und b, GULATI et al. 2004, KONG et al. 2004).

Die Perfusionfixation mit Formaldehyd bei der Opferung gewährleistet eine stabile Gefäßwandstruktur.

Die zur Bewertung herangezogenen Schnitte befinden sich in einem festgelegten Bereich im mittleren Abschnitt der Carotis. In diesem Gebiet lassen sich die lokal transplantierten Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit auffinden. Dabei werden die drei Schnitte mit der vermutlich größten Neointimabildung ausgewählt und aus diesen Werten der Mittelwert errechnet. Schneiden und Ausmessen der Carotiden erfolgt immer durch die gleiche Person und immer nach den gleichen Kriterien und Verfahrensweisen.

Die Elastica-van-Giesson-Färbung bietet dabei den Vorteil, dass sie die Strukturen der internen und externen elastischen Membran deutlich hervorhebt und die histomorphometrische Auswertung erleichtert. Der histologische Aufbau der Gefäßwand kann damit gut beurteilt werden.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist zum einen der Nachweis humaner, expandierter endothelialer Zellen in der Carotis der Nacktratte und zum anderen die Bestimmung der proliferierenden Zellen im Endothel, in der Neointima und der Media.

In zahlreichen Studien wird der Antikörper CD31 als Endothelzellmarker bzw. zur Identifikation von Zellen eingesetzt (TAKAHASHI et al. 1999, LIN et al. 2000, CHO et al. 2003).

Um die Spezifität des im eigenen Versuch eingesetzten Antikörpers gegen humane CD31-Oberflächenstruktur gewährleisten zu können, wird er in unterschiedlichen Verdünnungen und verschiedenen Gewebeproben mehrfach ausgetestet. Die Ergebnisse der Positiv- bzw. Negativkontrolle belegen seine Spezifität.

Ebenso wird der Proliferationsmarker Ki-67 bereits in verschiedenen Publikationen erwähnt (INDOLFI et al. 2002, DEWBERRY et al. 2003).

Der Ki-67, der zum Nachweis der proliferierenden Zellen eingesetzt wird, verhält sich dagegen nicht speziesspezifisch. Er färbt alle Zellen an, die mitotisch aktiv sind, d.h. die kurz vor einer Zellteilung stehen. Der Proliferationsmarker zeigt deshalb nicht nur die proliferierenden Zellen der Rattenzellen in der Neointima, sondern auch in der Doppelfärbung zusammen mit dem spezifischen Antikörper CD31 humane, mitotisch aktive, endotheliale Zellen auf.

Die Vorgehensweise bei der immunhistologischen Untersuchung erfolgt immer nach demselben Protokoll. Das Gelingen jeder durchgeführten immunhistologischen Färbung findet durch die positive Färbung des Kontrollgewebes eine Bestätigung. Die Auszählung der gefärbten Zellen wird wiederum von nur einer Person durchgeführt.

4.5 Endotheliale Vorläuferzellen-mögliche Therapieansätze in der Humanmedizin

Ein intaktes Endothel scheint auf natürliche Weise die Bildung von Neointima zu verhindern (LOSORDO et al. 2003).

Um diesen Schutz aufrechterhalten zu können, gibt es Reparaturmaßnahmen des Organismus in Form von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen, die sich dort anhaften und das Endothel wieder aufbauen können.

Aber die Anzahl dieser zirkulierenden Zellen ist im Zusammenhang vieler Risikofaktoren wie Rauchen oder Diabetes erniedrigt (VASA et al. 2001 a).

Um die Zahl der endothelialen Vorläuferzellen erhöhen zu können, gibt es nun zwei Möglichkeiten. Entweder durch Stimulation die körpereigene Produktion ansteigen zu lassen (KALKA et al. 2000 a, TAKAHASHI et al. 1999), oder aber ex vivo kultivierte Zellen wieder autolog zu transplantieren (KALKA et al. 2000 b). Die Abbildung 35 zeigt die möglichen Therapieansätze mit endothelialen Vorläuferzellen.

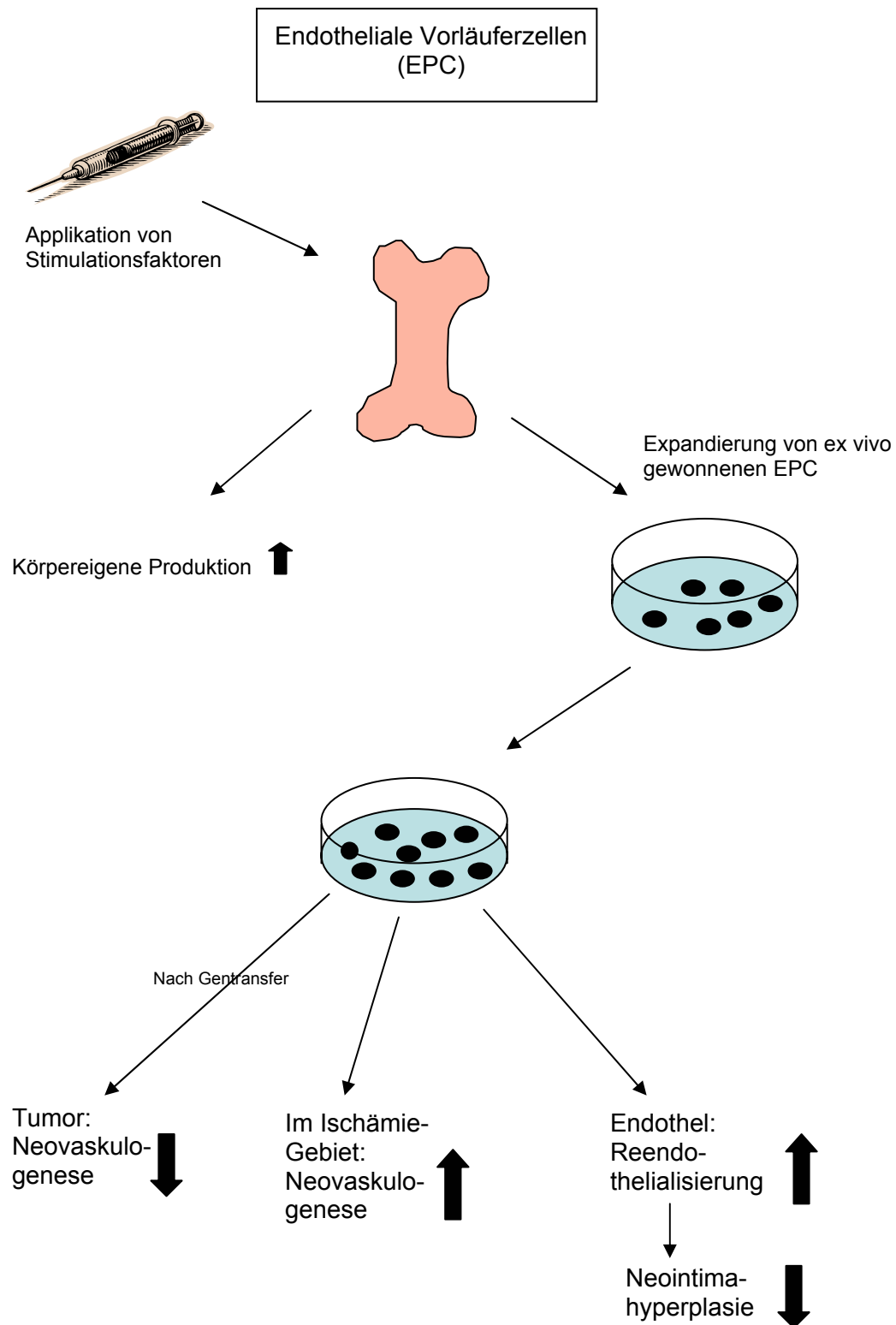


Abbildung 35: Therapieansätze

4.6 Endotheliale Zellen-welchen Nutzen haben sie für die Tiermedizin?

Atherosklerose und Myokardinfarkt, die in den Industrieländern ein Hauptproblem in der Humanmedizin darstellen (ROSS 1999, WORTHLEY et al. 2001), treten im Gegensatz dazu in der Tiermedizin nur sehr selten auf (DAHME und SCHRÖDER 1982, LIU et al. 1986, DAHME 1988).

Demzufolge stellen Therapieverfahren wie Angioplastie bzw. Stentimplantation reine humanmedizinische Eingriffe dar. Da die daraus resultierende Restenose kein tiermedizinisches Problem darstellt, kommt der Therapieansatz der Reendothelialisierung hier nicht in Frage.

Dagegen kann man sich einen Einsatz von endothelialen Zellen im Zusammenhang von Neovaskulogenese und Tumorgeschehen in der Tiermedizin sehr gut vorstellen.

Gerade im Bereich der Kleintiermedizin gewinnen Tumorkrankheiten immer mehr an Bedeutung. Aufgrund der heutigen medizinischen Versorgung können Hunde und Katzen ein hohes Alter erreichen. Mit zunehmendem Alter steigt aber auch die Inzidenz von Tumorkrankheiten (HIRSCHBERGER 2000).

Endotheliale Zellen können, da sie sehr leicht genetisch modifizierbar sind, ein ideales Modell zur antineoplastischen Therapie darstellen (BAGLEY et al. 2003).

Je mehr man allgemein über die Mechanismen und Wirkfunktionen dieser Zellen in Erfahrung bringt, umso mehr können sich die Erkenntnisse wie Mosaiksteinchen zusammenfügen und ein Gesamtbild ergeben.

Weitere Untersuchungen des IL-1ra scheinen auch für die Tiermedizin von Interesse zu sein. Der IL-1ra spielt nicht nur im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle, sondern auch bei anderen funktionellen Zusammenhängen wie z.B. beim Migrationsverhalten von Zellen oder beim Körpergewicht von IL-1ra-knock-out-Mäusen (HIRSCH et al. 1996).

4.7 Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass humane, expandierte endotheliale Zellen eine starke Gefäßläsion im Rattenmodell benötigen, um adhärieren zu können. Diese kann, wie die Evans Blue-Färbung und die Fluoreszenz beweisen, erst durch Drahtverletzung hervorgerufen werden. Die Ballonverletzung allein ist nicht in der Lage, eine Adhärenz zu bewirken, aber notwendig, um Neointimabildung auszulösen. Die Drahtverletzung allein wiederum ist nicht in der Lage, eine Hyperplasie zu bewirken.

Im Hauptversuch hat sich gezeigt, dass humane endotheliale Zellen durch eine bessere Reendothelialisierung eine signifikante Reduktion der Proliferation und auf diese Weise eine signifikante Reduktion Neointimahyperplasie erzielen.

Die Überexpression von IL-1ra in diesem lokal transplantierten Bereich kann keine weitere Reduktion der Neointima erreichen.

4.8 Ausblick

Die Überexpression von IL-1ra hat zwar keine weitere Reduktion der Neointimaproliferation bewirkt, aber die endothelialen Zellen können allein bereits eine Reduktion im Tiermodell der kombinierten Carotis-Verletzung der Nacktratte erzielen.

Die Gewinnung humaner endothelialer Zellen stellt einen einfachen Prozess dar. Außerdem sind sie über viralen Gentransfer dazu in der Lage, als Träger zu fungieren. Durch die selektierte Anhaftung an die beschädigte Gefäßwand können die durch Genveränderung bedingten Eigenschaften lokal untersucht werden. Doch zunächst muss noch die Frage geklärt werden, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, dass endotheliale Vorläuferzellen adhärieren können. Ebenso stellt sich die Frage, welche Aufgaben und Wirkungen der IL-1ra neben dem Entzündungsgeschehen noch ausübt.

Nicht nur die Mechanismen der Reendothelialisierung sondern auch der Zusammenhang zwischen Entzündungsgeschehen und Neointimahyperplasie ist noch in weiteren Untersuchungen zu klären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Restenose nach perkutaner interventioneller Therapie stellt eines der Hauptprobleme dieser Behandlungsmethode dar. Reendothelialisierungsstrategien können nützlich sein, die Neointimabildung zu verringern, da die lokale Transplantation von endothelialen Vorläuferzellen effektiv ist, um die endotheliale Integrität wieder herzustellen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Transplantation von endothelialen Zellen, die aus humanen CD34-positiven Zellen expandiert wurden, eine Reendothelialisation induzieren und dadurch eine Reduktion der Restenose nach Verletzung der A. carotis in Thymus-losen Nacktratten bewirken. Außerdem ist die zusätzliche Effektivität einer anti-inflammatorischen Behandlung zu beurteilen. Für diesen Zweck wurden die expandierten, endothelialen Zellen mit Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) stabil transfiziert und im Carotis-Verletzungsmodell untersucht.

In den Vorversuchen wurde eine Methode etabliert, die eine Adhäsion von transplantierten Zellen an die Gefäßwand nach Drahtverletzung induziert und in Kombination mit einer Ballondilatation nach zwei Wochen eine Neointimabildung bewirkt.

Nach Transplantation von expandierten, endothelialen Zellen ist eine Reduktion der Neointimabildung im Vergleich zu der Kontrollgruppe um ca. 26% zu beobachten. Diese Analysen wurden an seriellen, mit Elastica-van-Giesson gefärbten Schnitten durchgeführt. Die Reduktion der Neointima war assoziiert mit einer signifikanten Abnahme der proliferierenden Zellen in der Intima, die durch den immunologischen Nachweis von Ki-67 bestimmt wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die verbesserte Reendothelialisierung nach Transplantation von expandierten, endothelialen Zellen proliferative Signale in der Neointima verringert werden. Transfektion der Zellen mit IL-1ra zeigte jedoch keine weitere Reduktion der Neointimabildung. Die Transplantation von IL-1ra-transfizierten Zellen oder mit Kontrollvektor transfiziert, zeigten eine ähnliche Reduktion in Bezug auf die Neointimabildung wie die nicht transfizierten Zellen. Auf ähnliche Weise blieb die Anzahl der proliferierenden Zellen innerhalb der Neointima unverändert. Die immunhistochemische Analyse zeigte eine Abnahme der transplantierten Zellen innerhalb des Beobachtungszeitraumes, das lässt darauf schließen, dass eine initiale Reendothelialisierung ausreichend ist, um die Neointimabildung zu vermindern.

Die lokale Transplantation von endothelialen Zellen, die aus humanen CD34-positiven Zellen expandiert wurden, stellt einen neuen Therapieansatz zur Verhinderung der Restenose dar.

6 SUMMARY

Investigations of neointima generation after local transplantation of endothelial progeny expanded from human cells after carotid injury in athymic nude rats.

Restenosis after percutaneous interventional therapy is one of the major problems in interventional cardiology. Reendothelialization strategies may be beneficial since neointima generation is decreased. Local transplantation of endothelial progenitor cells is effective in re-establishing endothelial integrity. We, therefore, sought to investigate if endothelial progeny derived from human CD34⁺ cells is effective for reendothelialization and treatment of restenosis after carotid artery injury in athymic nude rats. Furthermore, we assessed additional effectiveness of anti-inflammatory treatment. Therefore, endothelial progeny was stably transfected with Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and evaluated in the carotid injury model.

Preliminary experiments established adhesion of transplanted cells after wire injury and adequate neointima generation two weeks after balloon injury.

Transplantation of endothelial cell progeny significantly decreased neointima formation by approximately 26% compared to the control group. Analysis was performed using serial Elastica van Gieson stainings. This was associated with a significant decrease in proliferating cells within the neointima detected by Ki-67 positive immunostaining. Thus, reendothelialization after transplantation of endothelial cell progeny may inhibit proliferative stimuli within the neointima. Overexpression of IL-1ra, however, showed no further reduction in neointima formation. Transplantation of cells transfected with IL-1ra or control vector showed a similar reduction in neointima generation than untransfected cells. Similarly the number of proliferating cells within the neointima remained unchanged. Immunohistochemical analysis demonstrated a decrease of transplanted cells within the observation period suggesting that initial reendothelialization is sufficient for inhibition of neointima generation. Local transplantation of endothelial progeny derived from CD34⁺ cells represents a novel therapeutic approach for inhibition of restenosis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AREND WP, GUTHRIDGE CJ

Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms.
Ann Rheum Dis 2000; 59 (suppl I): i60-i64

ARJOMAND H, TURI ZG, MCCORMICK D, GOLDBERG S

Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions.
Am Heart J 2003; 146: 787-796

ARRAS M, ITO WD, SCHOLZ D, WINKLER B, SCHAPER J, SCHAPER W

Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.
J Clin Invest 1998; 101: 40-50

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.
Science 1997, 275: 964-967

ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER JM

Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.
Circ Res 1999; 85: 221-228

ASAHARA T, KAWAMOTO A

Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis.
Am J Physiol Cell Physiol 2004; 287: C572-C579

ASSMANN G, CARMENA R, CULLEN P, FRUCHART J-C, JOSSA F, LEWIS B, MANCINI M, PAOLETTI R; FOR THE INTERNATIONAL TASK FORCE FOR THE PREVENTION OF CORONARY HEART DISEASE

Coronary heart disease: reducing the risk. A worldwide view.
Circulation 1999; 100: 1930-1938

ASSMUS B, SCHÄCHINGER V, TEUPE C, BRITTEN M, LEHMANN R, DÖBERT N, GRÜNWALD F, AICHER A, URBICH C, MARTIN H, HOELZER D, DIMMELER S, ZEIHNER AM

Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI).
Circulation 2002; 106: 3009-3017

AUGUSTIN HG, KOZIAN DH, JOHNSON RC

Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes.
BioEssays 1994; 16: 901-906

BADIMON L

Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models.
Thromb Haemost 2001; 86: 356-365

- BAGLEY RG, WALTER-YOHLING J, CAO X, WEBER W, SIMONS B, COOK BP, CHARTRAND SD, WANG C, MADDEN SL, TEICHER BA
Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium. Characterization and comparison with mature endothelial cells.
Cancer Res 2003; 63: 5866-5873
- BAUTERS C, MEURICE T, HAMON M, MCFADDEN E, LABLANCHE J-M, BERTRAND ME
Mechanisms and prevention of restenosis : from experimental models to clinical practice.
Cardiovasc Res 1996; 31: 835-846
- BHARGAVA B, KARTHIKEYAN G, ABIZAID AS, MEHRAN R
New approaches to preventing restenosis.
BMJ 2003; 327: 274-279
- BÖTTIGER BW, FLEISCHER F
Medikamentöse Therapie der koronaren Herzkrankheit.
Anaesthesist 1994; 43: 699-717
- BRAUNWALD E, PFEFFER MA
Ventricular enlargement and remodelling following acute myocardial infarction: mechanisms and management.
Am J Cardiol 1991; 68: 1D-6D
- BREHM M, ZEUS T, STRAUER BE
Stem cells-clinical application and perspectives.
Herz 2002; 27: 611-620
- CARMELIET P
Angiogenesis in health and disease.
Nature Med 2003; 9: 653-660
- CHAMBERLAIN J, GUNN J, FRANCIS S, HOLT C, CROSSMAN D
Temporal and spatial distribution of interleukin-1 β in balloon injured porcine coronary arteries.
Cardiovasc Res 1999; 44: 156-165
- CHEMICON® INTERNATIONAL
Broschüre von: QCM™- FN, Quantitative Cell Migration Assay Fibronectin.
CHEMICON® INTERNATIONAL, USA und Kanada, 2001: 1-3
- CHO H-J, KIM H-S, LEE M-M, KIM D-H, YANG H-J, HUR J, HWANG K-K, OH S, CHOI Y-J, CHAE I-H, OH B-H, CHOI Y-S, WALSH K, PARK Y-B
Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation.
Circulation 2003; 108: 2918-2925
- CHOI K, KENNEDY M, KAZAROV A, PAPADIMITRIOU JC, KELLER G
A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.
Development 1998; 125: 725-732

CINES DB, POLLAK ES, BUCK CA, LOSCALZO J, ZIMMERMAN GA, MCEVER RP, POBER JS, WICK TM, KONKLE BA, SCHWARTZ BS, BARNATHAN ES, MCCRAE KR, HUG BA, SCHMIDT A-M, STERN DM

Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.
Blood 1998; 91: 3527-3561

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM

Mechanisms of stenosis after arterial injury.

Lab Invest 1983(a); 49: 208-215

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.

Lab Invest 1983(b); 49: 327-333

CLOWES AW, CLOWES MM, FINGERLE J, REIDY MA

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation.

Lab Invest 1989; 60: 360-364

COLOTTA F, RE F, MUZIO M, BERTINI R, POLENTARUTTI N, SIRONI M, GIRI JG, DOWER SK, SIMS JE, MANTOVANI A

Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4.

Science 1993; 261: 472-475

COUFFINHAL T, DUFOURCQ P, JASPARD B, DARET D, ALLIÈRES C, ALZIEU P, SERRE P, BONNET J, DUPLÀA C

Kinetics of adventitial repair in the rat carotid model.

Coron Artery Dis 2001; 12: 635-648

CULLEN P, BAETTA R, BELLOSTA S, BERNINI F, CHINETTI G, CIGNARELLA A, VON ECKARDSTEIN A, EXLEY A, GODDARD M, HOFKER M, HURT-CAMEJO E, KANTERS E, KOVANEN P, LORKOWSKI S, MCPHEAT W, PENTIKÄINEN M, RAUTERBERG J, RITCHIE A, STAELS B, WEITKAMP B, DE WINTHER M FOR THE MAFAPS CONSORTIUM

Rupture of the atherosclerotic plaque. Does a good animal model exist?

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 535-542

DAHME E

Kreislauforgane.

In: DAHME E, WEISS E (Hrsg.): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 4. Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart, 1988: 1-36

DAHME E, SCHRÖDER B

Atherosklerose- Arteriosklerose.

In: KITT H. (Hrsg.): Lehrbuch der allgemeinen Pathologie. 9. Auflage, Enke-Verlag, Stuttgart, 1982: 176-177

DANENBERG HD, WELT FGP, WALKER III. M, SEIFERT P, TOEGEL GS, EDELMAN ER

Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide increases neointimal formation after balloon and stent injury in rabbits.

Circulation 2002; 105: 2917-2922

DE LEON H, OLLERENSHAW JD, GRIENDLING KK, WILCOX JN

Adventitial cells do not contribute to neointimal mass after balloon angioplasty of the rat common carotid artery.

Circulation 2001; 104: 1591-1593

DE SMET BJGL, VAN DER ZANDE J, VAN DER HELM YJM, KUNTZ RE, BORST C, POST M.J

The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling.

Cardiovasc Res 1998; 39: 224-232

DEWBERRY R, HOLDEN H, CROSSMAN D, FRANCIS S

Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2394-2400

DEWBERRY RM, CROSSMAN DC, FRANCIS SE

Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) genotype modulates the replicative capacity of human endothelial cells.

Circ Res 2003; 92: 1285-1287

DINARELLO CA

Biologic basis for interleukin-1 in disease.

Blood 1996; 87: 2095-2147

DOGGRELL SA, BROWN L

Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.

Cardiovasc Res 1998; 39: 89-105

DOSS K

Zum Einfluss von humanen, durch CD34+ Zellen expandierte, endotheliale Zellen auf die linksventrikuläre Funktion im Myokardinfarktmodell der Nacktratte.

Vetmed. Diss., LMU-München, in Vorbereitung

DOTTER CT

Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery.

Invest Radiol 1969; 4: 329-332

DROMMER W

Kreislauforgane.

In: NIEBERLE K, COHRS P (Begr.), DÄMMRICH K (Bearb.), SCHULZ L-C (Hrsg.):

Pathologie der Haustiere, Teil I Organveränderungen. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991: 69-74

EDELMAN ER, ROGERS C

Pathobiologic responses to stenting.

Am J Cardiol 1998; 81: 4E-6E

FARB A, SANGIORGI G, CARTER AJ, WALLEY VM, EDWARDS WD, SCHWARTZ RS, VIRMANI R

Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.

Circulation 1999; 99: 44-52

FARB A, WEBER DK, KOLODGIE FD, BURKE AP, VIRMANI R

Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans.

Circulation 2002; 105: 2974-2980

FERNS GA, REIDY MA, ROSS R

Balloon catheter de-endothelialization of the nude rat carotid. Response to injury in the absence of functional T lymphocytes.

Am J Path 1991; 138: 1045-1057

FINGERLE J, AU YP, CLOWES AW, REIDY MA

Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury.

Arteriosclerosis 1990; 10: 1082-1087

FISCHER P

Verhinderung von entzündlich bedingten, vaskulärpathologischen Prozessen durch die IL-1ra-Transduktion von endothelialen Zellen.

Med. Diss., TU-München, in Vorbereitung

FISHMAN JA, RYAN GB, KARNOVSKY MJ

Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening.

Lab Invest 1975; 32: 339-351

FRANCIS SE, CAMP NJ, DEWBERRY RM, GUNN J, SYRRIS P, CARTER ND, JEFFERY S, KASKI JC, CUMBERLAND DC, DUFF GW, CROSSMAN DC

Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease.

Circulation 1999; 99: 861-866

FRANCIS SE, CAMP NJ, BURTON AJ, DEWBERRY RM, GUNN J, STEPHENS-LLOYD A, CUMBERLAND DC, GERSHLICK A, CROSSMAN DC

Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty.

Heart 2001; 86: 336-340

FRECH M

Wirkung von IL-1 β auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten.

Med. dent. Diss., LMU-München, in Vorbereitung

FREEDMAN SB, ISNER JM

Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease.

Ann Intern Med 2002; 136: 54-71

FUJIYAMA S, AMANO K, UEHIRA K, YOSHIDA M, NISHIWAKI Y, NOZAWA Y, JIN D, TAKAI S, MIYAZAKI M, EGASHIRA K, IMADA T, IWASAKA T, MATSUBARA H
Bone marrow monocyte lineage cell adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells.
Circ Res 2003; 93: 980-989

GAMS E
Chirurgische Therapie der koronaren Herzerkrankungen.
Internist 1997; 38: 64-72

GEHLING UM, ERGÜN S, SCHUMACHER U, WAGENER C, PANTEL K, OTTE M, SCHUCH G, SCHAFFHAUSEN P, MENDE T, KILIC N, KLUGE K, SCHÄFER B, HOSSFELD DK, FIEDLER W
In vitro differentiation of endothelial cells from AC133- positive progenitor cells.
Blood 2000; 95: 3106-3112

GINZINGER DG, WILSON JE, REDENBACH D, LEWIS MES, CLEE SM, ASHBOURNE EXCOFFON KJD, ROGERS QR, HAYDEN MR, MCMANUS BM
Diet-induced atherosclerosis in the domestic cat.
Lab Invest 1997; 77: 409-419

GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS CK, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS GJ
Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.
N Engl J Med 1987; 316: 1371-1375

GRANOWITZ EV, PORAT R, MIER JW, PRIBBLE JP, STILES DM, BLOEDOW DC, CATALANO MA, WOLFF SM, DINARELLO CA
Pharmacokinetics, safety and immunomodulatory effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans.
Cytokine 1992; 4: 353-360

GRECH ED
ABC of interventional cardiology: percutaneous coronary intervention.II: the procedure.
BMJ 2003; 326: 1137-1140

GRIESE DP, ACHATZ S, BATZLSPERGER CA, STRAUCH UG, GRUMBECK B, WEIL J, RIEGGER GAJ
Vascular gene delivery of anticoagulants by transplantation of retrovirally-transduced endothelial progenitor cells.
Cardiovasc Res 2003 (a); 58: 469-477

GRIESE DP, EHSAN A, MELO LG, KONG D, ZHANG L, MANN MJ, PRATT RE, MULLIGAN RC, DZAU VJ
Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts. Implications for cell-based vascular therapy.
Circulation 2003 (b); 108: 2710-2715

GRÜNTZIG A
Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis.
Lancet 1978; 1: 263

GULATI R, JEVREMOVIC D, WITT TA, KLEPPE LS, VILE RG, LERMAN A, SIMARI RD

Modulation of the vascular response to injury by autologous blood-derived outgrowth endothelial cells.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287: H512-H517

HAN C-I, CAMPBELL GR, CAMPBELL JH

Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation.

J Vasc Res 2001; 38: 113-119

HAUDENSCHILD CC, SCHWARTZ SM

Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity.

Lab Invest 1979; 41: 407-418

HERLITZ J

Secondary prevention after coronary artery bypass grafting-what do we know?

Scand Cardiovasc J 2004; 38: 69-74

HIRSCH E, IRIKURA VM, PAUL SM, HIRSH D

Functions of interleukin 1 receptor antagonist in gene knockout and overproducing mice.

Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 11008-11013

HIRSCHBERGER J

Klinische Onkologie.

In: KRAFT W, HIRSCHBERGER J (Hrsg.): Kleintierkrankheiten, Band 1, Innere Medizin. 3. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2000: 821-860

HÖFLING B, GONSCHIOR P, ESIN S, NIKOL S

Das Problem der Restenose nach Angioplastie-Klinische Bedeutung, Pathobiologie, zukünftige Entwicklung zur Suppression der Rezidivstenose.

Internist 1997; 38: 31-43

HOLMES DR

In-stent restenosis.

Rev Cardiovasc Med 2001; 2: 115-119

HOMBACH V, KOCHS M, HÖHER M, OSTERHUES HH, KOENIG W, WEISMÜLLER P

Alternativen zur Ballonangioplastie.

Internist 1997; 38: 11-19

HRISTOV M, ERL W, WEBER PC

Endothelial progenitor cells.

Mobilization, differentiation, and homing.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1185-1189

HUGHES S

Cardiac stem cells.

J Pathol 2002; 197: 468-478

INDOLFI C, ESPOSITO G, DI LORENZO E, RAPACCIUOLO A, FELICIELLO A, PORCELLINI A, AVVEDIMENTO VE, CONDORELLI M, CHIARIELLO M
Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty.
Circulation 1995; 92: 1230-1235

INDOLFI C, TORELLA D, COPPOLA C, STABILE E, ESPOSITO G, CURCIO A, PISANI A, CAVUTO L, ARCUCCI O, CIREDU M, TRONCONE G, CHIARIELLO M
Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: H760-H767

ISODA K, SHIIGAI M, ISHIGAMI N, MATSUKI T, HORAI R, NISHIKAWA K, KUSUHARA M, NISHIDA Y, IWAKURA Y, OHSUZU F
Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury.
Circulation 2003; 108: 516-518

JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK, GOODELL MA
Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.
J Clin Invest 2001; 107: 1395-1402

JAWIEŃ J, NASTALEK P, KORBUT R
Mouse models of experimental atherosclerosis.
J Physiol Pharmacol 2004; 55: 503-517

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, GORDON R, TEPPER O, GRAVEREAUX E, PIECZEK A, IWAGURO H, HAYASHI S-I, ISNER JM, ASAHARA T
Vascular endothelial growth factor₁₆₅ gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects.
Circ Res 2000 (a); 86: 1198-1202

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LI T, ISNER JM, ASAHARA T
Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.
Proc Natl Acad Sci USA 2000 (b); 97: 3422-3427

KANTOR B, ASHAI K, HOLMES DR, SCHWARTZ RS
The experimental animal models for assessing treatment of restenosis.
Cardiovasc Radiat Med 1999; 1: 48-54

KASTRATI A, MEHILLI J, DIRSCHINGER J, PACHE J, ULM K, SCHÜHLEN H, SEYFARTH M, SCHMITT C, BLASINI R, NEUMANN F-J, SCHÖMIG A
Restenosis after coronary placement of various stent types.
Am J Cardiol 2001; 87: 34-39

KAUFMANN U, MEIER B
Derzeitiger Stand der Stentimplantation.
Internist 1997; 38: 20-26

KAWAMOTO A, GWON H-C, IWAGURO H, YAMAGUCHI J-I, UCHIDA S, MASUDA H, SILVER M, MA H, KEARNEY M, ISNER JM, ASAHARA T
Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia.
Circulation 2001; 103: 634-637

KEREIAKES DJ
Adjunctive pharmacotherapy before percutaneous coronary intervention in non-st-elevation acute coronary syndromes: the role of modulating inflammation.
Circulation 2003; 108[suppl III]: III-22-III-27

KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOFF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves function.
Nat Med 2001; 7: 430-436

KOLENDA K-D
Sekundärprävention der koronaren Herzkrankheit: Wie wirksam sind die modernen Behandlungsmethoden?
Dtsch Med Wschr 2003; 128: 1849-1853

KONG D, MELO LG, MANGI AA, ZHANG L, LOPEZ-ILASACA M, PERRELLA MA, LIEW CC, PRATT RE, DZAU VJ
Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells.
Circulation 2004; 109: 1769-1775

KOOLMAN J
Hormone der Epiphyse und des Immunsystems.
In: KARLSON P, DOENECKE D, KOOLMAN J (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14., neubearb. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994: 447-450

KUNTZ RE, BAIM DS
Defining coronary restenosis. Newer clinical and angiographic paradigms.
Circulation 1993; 88: 1310-1323

LAFONT A, FAXON D
Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials?
Cardiovasc Res 1998; 39: 50-59

LAFONT A, GUZMAN LA, WHITLOW PL, GOORMASTIC M, CORNHILL JF, CHISOLM GM
Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial and adventitial changes associated with constrictive remodeling.
Circ Res 1995; 76: 996-1002

LAUPER NT, UNNI KK, KOTTKE BA, TITUS JL
Anatomy and histology of aorta of White Carneau pigeon.
Lab Invest 1975; 32: 536-551

LEMOS PA, SERRUYS PW, SOUSA JE
Drug-eluting stents. Costs versus clinical benefit.
Circulation 2003; 107: 3003-3007

LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A
Inflammation and atherosclerosis.
Circulation 2002; 105: 1135-1143

LIN Y, WEISDORF DJ, SOLOVEY A, HEBBEL RP
Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.
J Clin Invest 2000; 105: 71-77

LINDNER V, FINGERLE J, REIDY MA
Mouse model of arterial injury.
Circ Res 1993; 73: 792-796

LIU S-K, TILLEY LP, TAPPE JP, FOX PR
Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983).
J Am Vet Med Assoc 1986; 189: 227-232

LOSORDO DW, ISNER JM, DIAZ- SANDOVAL LJ
Endothelial recovery. The next target in restenosis prevention.
Circulation 2003; 107: 2635-2637

LUO H, NISHIOKA T, EIGLER NL, FORRESTER JS, FISHBEIN MC, BERGLUND H, SIEGEL RJ
Coronary artery restenosis after balloon angioplasty in human is associated with circumferential coronary constriction.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 1393-1398

LÜSCHER TF, TSCHUDI MR, WENZEL RR, NOLL G
Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid (NO; Nitric Oxide).
Internist 1997; 38: 411-419

LYDEN D, HATTORI K, DIAS S, COSTA C, BLAIKIE P, BUTROS L, CHADBURN A, HEISSIG B, MARKS W, WITTE L, WU Y, HICKLIN D, ZHU Z, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MAS, HAJJAR KA, MANOVA K, BENEZRA R, RAFII S
Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hemapoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth.
Nat Med 2001; 7: 1194-1201

MINTZ GS, POPMA JJ, PICHARD AD, KENT KM, SATLER LF, WONG SC, HONG MK, KOVACH JA, LEON MB
Arterial remodeling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study.
Circulation 1996; 94: 35-43

MULLER DWM, ELLIS SG, TOPOL EJ

Experimental models of coronary artery restenosis.

J Am Coll Cardiol 1992; 19: 418-432

MURRAY CJL, LOPEZ AD

Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study.

Lancet 1997; 349: 1436-1442

NABEL EG

Cardiovascular disease.

N Engl J Med 2003; 349: 60-72

NAMIKI A, BROGI E, KEARNEY M, KIM EA, WU T, COUFFINHAL T, VARTICOVSKI L, ISNER JM

Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells.

J Biol Chem 1995; 270: 31189-31195

NEWBY AC, ZALTSMAN AB

Molecular mechanisms in intimal hyperplasia.

J Pathol 2000; 190: 300-309

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH)

The adult stem cell.

In: Stem cells: scientific progress and future directions. US department of health and human services, <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>, 2001: 23-42

(Datum des Zugriffs: 29.09.2004)

NHLBI (NATIONAL HEART LUNG, AND BLOOD INSTITUTE)

Background data.

In: Morbidity and mortality: 2004 chart book of cardiovascular, lung, and blood diseases. US department of health and human services, <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>, 2004: 5-18

(Datum des Zugriffs: 15.10.2004)

NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S

Nachweismethoden.

In: HÖFLER H und MÜLLER K-M (Hrsg.): Praxis der Immunhistochemie. Urban und Fischer, München, Jena, 2000: 13-19

O'BRIEN ER, SCHWARTZ SM

Update on the biology and clinical study of restenosis.

Trends Cardiovasc Med 1994; 4: 169-178

OLIVETTI G, CAPASSO JM, MEGGS LG, SONNENBLICK EH, ANVERSA P

Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats.

Circ Res 1991; 68: 856-869

O'NEILL WW, LEON MB

Drug-eluting stents. Costs versus clinical benefit.

Circulation 2003; 107: 3008-3011

ORLIC D, HILL JM, ARAI AE

Stem cells for myocardial regeneration.

Circ Res 2002; 91: 1092-1102

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.

Nature 2001; 410: 701-705

PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MAS, RAFII S

Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors.

Blood 2000; 95: 952-958

PHILIPP R, GRECH ED

ABC of interventional cardiology: interventional pharmacotherapy.

BMJ 2003; 327: 43-46

POPE III. CA, BURNETT RT, THURSTON GD, THUN MJ, CALLE EE, KREWSKI D, GODLESKI JJ

Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution.

Epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease.

Circulation 2004; 109: 71-77

POPMA JJ, ELLIS SG

Intracoronary stents: clinical and angiographic results.

Herz 1990; 15: 307-318

POST MJ, DE SMET BJGL, VAN DER HELM Y, BORST C, KUNTZ RE

Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model.

Circulation 1997; 96: 996-1003

PROCTOR SD, MAMO JCL

Intimal retention of cholesterol derived from apolipoprotein B100- and apolipoprotein B48-containing lipoproteins in carotid arteries of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1595-1600

RAJAGOPAL V, ROCKSON SG

Coronary restenosis: a review of mechanisms and management.

Am J Med 2003; 115: 547-553

RIBATTI D

The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis.

J Cell Mol Med 2004; 8: 294-300

RIEDE U-N, SCHAEFER H-E

Arterien.

In: RIEDE U-N, SCHAEFER H-E (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1993: 436-442

RISAU W, FLAMME I

Vasculogenesis.

Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11: 73-91

ROSS R, GLOMSET JA

The pathogenesis of atherosclerosis (Second of two parts).

N Engl J Med 1976; 295: 420-425

ROSS R

Atherosclerosis- an inflammatory disease.

N Engl J Med 1999; 340: 115-126

SCHÖMIG A, NEUMANN F-J, KASTRATI A, SCHÜHLEN H, BLASINI R,
HADAMITZKY M, WALTER H, ZITZMANN-ROTH E-M, RICHARDT G, ALT E,
SCHMITT C, ULM K

A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents.

N Engl J Med 1996; 334: 1084-1089

SCHRENK M

Berühmte „Fälle“.

In: Aus der Geschichte der Kardiopathologie: Die Heberden'sche Angina-Pectoris (1768).

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Casella-Riedel Pharma GmbH, Frankfurt/M, 1969:
39-41

SCHWARTZ RS

Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more.

Lab Invest 1994; 71: 789-791

SCHWARTZ RS

Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/ or remodeling.

Am J Cardiol 1998; 81: 14E-17E

SCHWARTZ RS, HENRY TD

Pathophysiology of coronary artery restenosis.

Rev Cardiovasc Med 2002; 3(suppl 5): S4-S5

SCHWARTZ RS, HUBER KC, MURPHY JG, EDWARDS WD, CAMRUD AR,
VLIETSTRA RE, HOLMES DR

Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model.

J Am Coll Cardiol 1992; 19: 267-274

SCHWARTZ SM, DEBLOIS D, O'BRIEN ERM

The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis.

Circ Res 1995; 77: 445-465

SCHWARTZ RS, TOPOL EJ, SERRUYS PW, SANGIORGI G, HOLMES DR

Artery size, neointima, and remodeling. Time for some standards.

JACC 1998; 32: 2087-2094

SHEPHERD J, COBBE SM, FORD I, ISLES CG, LORIMER AR, MACFARLANE PW, MCKILLOP JH, PACKARD CJ
Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group.
N Engl J Med 1995; 333: 1301-1307

SHI Q, RAFII S, WU MH, WIJELATH ES, YU C, ISHIDA A, FUJITA Y, KOTHARI S, MOHLE R, SAUVAGE LR, MOORE MAS, STORB RF, HAMMOND WP
Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.
Blood 1998; 92: 362-367

SHI Y, O'BRIEN JE, FARD A, MANNION JD, WANG D, ZALEWSKI A
Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries.
Circulation 1996; 94: 1655-1664

SIGWART U
Koronare Endoprothesen (Stents).
Herz 1990; 15: 319-328

SIGWART U, PUEL J, MIRKOVITCH V, JOFFRE F, KAPPENBERGER L
Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty.
N Engl J Med 1987; 316: 701-706

SIMPER D, WANG S, DEB A, HOLMES D, MCGREGOR C, FRANTZ R, KUSHWAHA SS, CAPLICE NM
Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis.
Circulation 2003; 108: 143-149

SIMS FH, GAVIN JB, VANDERWEE MA
The intima of human coronary arteries.
Am Heart J 1989; 118: 32-38

STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOV S, GUYTON JR, INSULL W, ROSENFELD ME, SCHAFFER A, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW
A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis-a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.
Circulation 1994; 89: 2462-2478

STEMERMAN MB, SPAET TH, PITLICK F, CINTRON J, LEJNIEKS I, TIELL ML
Intimal Healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening.
Am J Pathol 1977; 87: 125-142

STRAUER BE
Interventionelle Verfahren in der Kardiologie.
Internist 1997; 38: 1-2

STRAUER BE, KORNOWSKI R
Stem cell therapy in perspective.
Circulation 2003; 107: 929-934

STREHLOW K, WERNER N, BERWEILER J, LINK A, DIRNAGL U, PRILLER J, LAUFS K, GHAENI L, MILOSEVIC M, BÖHM M, NICKENIG G
Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation.
Circulation 2003; 107: 3059-3065

SUTER PF
Blut- und Lymphgefäßerkrankungen.
In: SUTER PF (Hrsg.): Praktikum der Hundeklinik. 7. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1994: 424-428

TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T
Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.
Nat Med 1999; 5: 434-438

TANAKA K, SATA M, HIRATA Y, NAGAI R
Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.
Circ Res 2003; 93: 783-790

TEWARI A, BUHLES WC JR, STARNES HF JR
Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts.
Lancet 1990; 336: 712-714

TRAUTVETTER E
Herz-Kreislauf-Syndrome.
In FREUDIGER U, GRÜNBAUM E-G, SCHIMKE E (Hrsg.): Klinik der Hundekrankheiten. 2., überarb. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1997: 407-411

URBICH C, DIMMELER S
Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology.
Circ Res 2004; 95: 343-353

VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S
Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.
Circ Res 2001 (a); 89: e1-e7

VASA M, FICHTLSCHERER S, ADLER K, AICHER A, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S
Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease.
Circulation 2001 (b); 103: 2885-2890

- WAKABAYASHI G, GELFAND JA, JUNG WK, CONNOLLY RJ, BURKE JF, DINARELLO CA
Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli.
J Clin Invest 1991; 87: 1925-1935
- WALTER DH, RITTIG K, BAHLMANN FH, KIRCHMAIR R, SILVER M, MURAYAMA T, NISHIMURA H, LOSORDO DW, ASAHARA T, ISNER JM
Statin therapy accelerates reendothelialization. A novel effect involving mobilization and incorporation of bone-marrow-derived endothelial progenitor cells.
Circulation 2002; 105: 3017-3024
- WANG X, ROMANIC AM, YUE T-L, FEUERSTEIN GZ, OHLSTEIN EH
Expression of interleukin-1 β , interleukin-1 receptor, and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in rat carotid artery after balloon angioplasty.
Biochem Biophys Res Commun 2000; 271: 138-143
- WEGENER F
Ein pleiotroper Ansatz zu Inhibition der Neointimahyperplasie nach experimenteller Gefäßverletzung: funktionelle, histomorphometrische und immunhistochemische Charakterisierung der rekombinanten Überexpression des Interferon Regulator Faktor 1 (IRF1) nach adenoviralem Gentransfer in die Gefäßwand der Ratte.
Vetmed. Diss., München, 2002: 36-37
- WERNER N, JUNK S, LAUFS U, LINK A, WALENTA K, BÖHM M, NICKENIG G
Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury.
Circ Res 2003; 93: e17-e24
- WORTHLEY SG, OSENDE JI, HELFT G, BADIMON JJ, FUSTER V
Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes.
Mt Sinai J Med 2001; 68: 167-181
- YANG A-L, JEN CJ, CHEN H
Effects of high- cholesterol diet and parallel exercise training on the vascular function of rabbit aortas: a time course study.
J Appl Physiol 2003; 95: 1194-1200
- ZALEWSKI A, SHI Y, JOHNSON AG
Diverse origin of intimal cells. Smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond?
Circ Res 2002; 91: 652-655
- ZUBAIR AC, SILBERSTEIN L, RITZ J
Adult hematopoietic stem cell plasticity.
Transfusion 2002; 42: 1096-1101

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Schematischer Überblick über den experimentellen Verlauf der vorliegenden Studie	32
Tabelle 2: Fluoreszenznachweis der Zellen nach a) 24h und b) 14 d	35
Tabelle 3: Übersicht zu den Antikörpern	54
Tabelle 4: Ergebnisse der Auswertung der Gefrierschnitte im Fluoreszenzmikroskop	58
Tabelle 5: Anzahl der auswertbaren Proben der Hauptversuchsgruppe	62
Tabelle 6: Ergebnisse der EC- und der Kontrollgruppe	63
Tabelle 7: Daten der histomorphometrischen Auswertung von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe	65
Tabelle 8: Ergebnisse der Proliferationsdaten von der EC- und der Kontrollgruppe	70
Tabelle 9: Ergebnisse der Proliferationsdaten von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe	72

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema einer einfachen Ballonangioplastie (PTCA) (modifiziert nach GRECH, 2003)	9
Abbildung 2: Querschnitt einer restenosierten Arterie, 5fache Vergrößerung, modifiziert nach O'BRIEN und SCHWARTZ (1994).....	12
Abbildung 3: Migration glatter Muskelzellen (SMC) aus der Media in die Intima durch die gefensterte innere elastische Membran (modifiziert nach ROSS und GLOMSET, 1976)	14
Abbildung 4: Ablauf der Restenose im Vergleich (modifiziert nach RAJAGOPAL und ROCKSON, 2003).....	17
Abbildung 5: Stammzellen und Vorläuferzellen, die aus dem Hämangioblasten hervorgehen (modifiziert nach ASAHARA und KAWAMOTO, 2004).....	20
Abbildung 6: QCM-FN Boyden Chamber (aus der Broschüre von CHEMICON QCM™-FN Assay)	38
Abbildung 7: Gefärbte EC nach einem Migrationsversuch.....	39
Abbildung 8: Übersicht auf den Operationstisch und die verwendeten Materialien.....	41
Abbildung 9: Schema der Gefäßabgänge und Ligaturen nach Abschluss der PTA (modifiziert nach WEGENER, 2002).....	43
Abbildung 10: Carotis einer Ratte mit Neointimahyperplasie, 5fache Vergrößerung.....	47
Abbildung 11: Doppeltgefärbte, humane endotheliale Zellen, 100fache Vergrößerung	48
Abbildung 12: Schema der LSAB-Methode, dargestellt werden Primärantikörper, biotinylierter Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNEN, 2000)	49
Abbildung 13: Schema der APAAP-Methode, dargestellt werden Primär- und Brückenantikörper, so wie der APAAP-Komplex (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNEN, 2000)	50
Abbildung 14: linke A. carotis communis mit Drahtverletzung nach Evans Blue-Färbung (Schwarz-Weiß-Aufnahme)	56
Abbildung 15: linke A. carotis communis mit Ballonverletzung nach Evans Blue-Färbung (Schwarz-Weiß-Aufnahme).....	56
Abbildung 16: linke ACC mit Drahtverletzung nach 14 Tagen, E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung.....	57

Abbildung 17: linke ACC mit Ballonverletzung nach 14 Tagen, E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung.....	57
Abbildung 18: PKH26-gelabelte Zellen, 14 Tage nach Drahtverletzung	59
Abbildung 19: Kontrolle nach 14 Tagen.....	59
Abbildung 20: Übersichtsbild, Carotis 24 Stunden nach Drahtverletzung und Applikation von humanen, endothelialen Zellen, DAB-Färbung, 5fache Vergrößerung.....	60
Abbildung 21: Ausschnittsvergrößerung von Abbildung 21, 100fache Vergrößerung	61
Abbildung 22: Vergleich des Intima/Media-Verhältnisses von der EC- und der Kontrollgruppe	64
Abbildung 23: Vergleich des I/M-Verhältnisses von der IL-1ra- und der Leervektorgruppe .	66
Abbildung 24: Beispielbilder für ein Kontrolltier (links) und ein EC-Tier (rechts) in der E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung	67
Abbildung 25: Beispielbilder für die Leervektor- (links) und die IL-1ra-Gruppe (rechts) in der E.v.G.-Färbung, 5fache Vergrößerung	68
Abbildung 26: Schematischer Längsschnitt einer restenosierten Carotis	69
Abbildung 27: Verlauf der Neointima auf der Länge der Carotis bei einem Tier	69
Abbildung 28: Proliferationsindex der EC- und der Kontrollgruppe im Vergleich.....	71
Abbildung 29: Proliferationsindex der IL-1ra- und der Leervektorgruppe im Vergleich.....	73
Abbildung 30: Ausschnitt von einem Kontrolltier nach Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67, 40fache Vergrößerung.....	74
Abbildung 31: Proliferierende Zellen in einem mit EC behandelten Tier, 40fache Vergrößerung.....	74
Abbildung 32: Ausschnitt aus einem mit Ki-67 gefärbten Schnitte von einem IL-1ra-Tier, 40fache Vergrößerung	75
Abbildung 33: Proliferierende Zellen von einem Leervektortier, 40fache Vergrößerung.....	75
Abbildung 34: Migrationsversuch nach Stimulation von Interleukin-1 β	85
Abbildung 35: Therapieansätze.....	89

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A (Neo)Intima	Fläche (Neo)Intima
A Lumen	Fläche Lumen
A Media	Fläche Media
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ACC	A. carotis communis
ACCLI	Linke A. carotis communis
ACCRe	Rechte A. carotis communis
ACE	A. carotis externa
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACI	A. carotis interna
ADP	Adenosin-diphosphat
AK	Antikörper
Ang	Angiopoietin
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
apoE	Apolipoprotein E
ASS	Acetylsalicylsäure
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CD34+	CD34-positiv
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
d	Tag
DAB	3,3Diaminobenzidin
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
EBM-2	Endothelial Cell Basal Medium-2
EC	Endotheliale Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EPC	Endothelial Progenitor Cells= Endotheliale Vorläuferzellen
et al.	et alii, und Mitarbeiter
E.v.G.	Elastica-van-Giesson
FCS	Fetales Kälberserum
Flk-1	Fetal-liver-kinase-1-receptor
g	Gramm
GM-CFS	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
h	Stunde
HepesBSS	Gepufferte Salzlösung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High-Density-Lipoprotein
HM	Histomorphometrie
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
i.v.	intravenös
I/M	Intima/Media-Verhältnis
IgG	ImmunglobulinG
IHC	Immunhistochemie
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IL-RN	Interleukin-Rezeptorgen
ISR	In-Stent-Restenose
KDR	Kinase-insert-domain-containing-receptor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ki-67	Proliferationsmarker
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LSAB	Labeled-Strept-Avidin-Biotin
MACS	Magnetic-Cell-Sorting
MCP	Monozyten-Chemoattractant-Protein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM-1	Platelet-endothelial-cell-adhesions-molecule-1
PKH26	Rotfluoreszierender Farbstoff
PIGF	Placenta Growth Factor
pLXSN	Plasmid für Leervektor
PTA	Perkutane Transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
s.	Signifikant
s.c.	Subkutan
SMC	smooth muscle cells=glatte Muskelzellen
SEM	Standardfehler
TNS	Trypsin-Neutralizing-Solution
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
V.	Vena
VE	Vascular Endothelial
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Rezeptor für VEGF
vs	versus
vWF	von Willebrandfaktor

11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit und deren Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Gänsbacher bedanke ich mich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten in der Experimentellen Onkologie und Chirurgie.

Ich danke Frau PD Dr. med. I. Ott ganz besonders für die interessante Themenstellung und die hervorragende Projektbetreuung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt danke ich für die stets freundliche Betreuung und die sorgfältige Durchsicht dieses Manuskriptes.

Bei Herrn Dr. phil. R. Oostendorp und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die kooperative Unterstützung des Projektes.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. R. Brandl für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor der Gefäßchirurgie im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

Bei Frau Dr. med. M. Rudelius, Herrn Dr. med. T. Richter und Herrn Dr. med. S. Seidl möchte ich mich für die wissenschaftliche Betreuung und die fachliche Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Genauso bedanke ich mich bei Frau Dr. med. vet. C. Michaelis für die experimentelle Durchführung und die stets äußerst kollegiale Hilfe.

Ich danke Frau R. Hegenloh für die ausführliche und akkurate Einarbeitung.

Ein besonderes Dankeschön an Frau C. Bauer und Frau B. Campbell für die überaus freundliche Zusammenarbeit.

DANKSAGUNG

Bei allen Mitdoktoranden bedanke ich mich für die mentale Unterstützung.

Ein Dankeschön auch an die Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Institutes für die liebevolle Betreuung der Tiere.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei dieser Arbeit stets unterstützt haben.

12 LEBENS LAUF

03.08.1975	geboren in Ehingen an der Donau
1982 bis 1986	Besuch der Grundschule der Michel-Buck-Schule in Ehingen
1986 bis 1995	Besuch des Ehinger Gymnasiums
1995	Abitur
11.1995 bis 04.2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Abschluss mit dem III. Staatsexamen
25.04.2002	Approbation als Tierärztin
05.2002 bis 12.2003	Wissenschaftliche Angestellte der I. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München
Seit 05.2002	Promotion am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München